



Tesis doctoral

**ACCIÓN REGENERADORA DE LAS MIOFIBRILLAS MEDIANTE LA
APLICACIÓN DE MONOCITOS MEDULARES (CMN) EN TEJIDO
MUSCULAR ALTERADOS POR LA ACCIÓN DEL BISFENOL A**

***(REGENER REGENERATING ACTION OF MYOFIBRILS THROUGH THE APPLICATION OF
MEDULAR MONOCYTES (CMN) IN MUSCLE TISSUE ALTERED BY THE ACTION OF
BISPHENOL A)***

Carlos Abellán Ortiz

Directoras: Dra. Dña. M^a del Rosario Moyano Salvago

Dra. Dña. Ana M^a Molina López

Universidad de Córdoba

Programa de Doctorado de Biociencias y Ciencias Agroalimentarias

TITULO: ACCIÓN REGENERADORA DE LOS MIOFIBRILLAS MEDIANTE LA
APLICACION DE MONOCITOS MEDULARES (CMN) EN TEJIDO
MUSCULAR ALTERADOS POR LA ACCIÓN DEL BISFENOL A

AUTOR: *Carlos Abellán Ortiz*

© Edita: UCOPress. 2019
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

<https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/>
ucopress@uco.es



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Directora: Dra. Dña. María Rosario
Moyano Salvago. Catedrática de
Farmacología, Toxicología y
Medicina Legal y Forense

VºBº: Mª del Rosario Moyano
Salvago

Directora: Dra. Dña. Ana Mª Molina
López. Contratada Doctora del
Departamento de Farmacología,
Toxicología y Medicina Legal y
Forense

VºBº: Ana Mª Molina López

Memoria presentada por la Lda. Carlos Abellán Ortiz para optar al grado de
Doctor en Medicina.

Fdo.: Carlos Abellán Ortiz



TÍTULO DE LA TESIS: ACCIÓN REGENERADORA DE LAS MIOFIBRILLAS MEDIANTE DE MONOCITOS MEDULARES (CMN) EN TEJIDO MUSCULAR ALTERADOS POR LA ACCIÓN DEL BISFENOL A

DOCTORANDO: Carlos Abellán Ortiz

INFORME RAZONADO DE LOS DIRECTORES DE LA TESIS

En primer lugar el doctoranda, dentro de su especialidad, desarrolló los objetivos del trabajo, que consistieron en no sólo conocer la evolución de los mioblastos y miobibrillas por la acción del disruptor, sino también la regeneración de los mioblastos y la fibra muscular, y la recuperación de la morfología del musculo afectados con los tratamientos Monocitos Medulares (CMN). Se utilizó como modelo cerdos *Minipig* procedentes del Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba un grupo de experimentación, donde se llevó a cabo el estudio.

Se han utilizado numerosas técnicas experimentales tanto el microscopio óptico como electrónico, y técnicas histoenzimológicas en el Dpto. de Anatomía y Anatomía Comparadas, en el Dpto. Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense, en el Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) y las modificaciones encontradas fueron cuantificadas con los correspondientes programas estadísticos.

Se destaca que con las conclusiones obtenidas se cubrieran las expectativas expuestas en los objetivos.

La publicación relacionada con dicha tesis está recogida en el Journal of the Faculty of Veterinary Medicine University of Zagreb, *Veterinaski Archiv* (se

adjunta) y se titula: Evaluation of treatment with bone marrow derived monocytes of minipigs in muscle bres after exposure to Bisphenol-A Carlos Abellán, Ana Molina, Cristina Bellido, Alfonso Blanco, Rosario Moyano. *Veterinaski Archiv* 89 (3), 379-391, 2019

Tanto el trabajo experimental, como el de laboratorio los realizó el doctorando personalmente, y fueron supervisados conforme se llevaban a cabo.

Consideramos que el trabajo contiene todos los elementos de una investigación, con una metodología clara y se obtuvieron unos resultados muy aceptables.

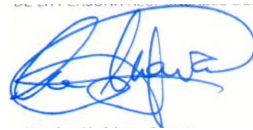
Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 28 de octubre de 2019

Firma de las directoras



Fdo.:Mª del Rosario Moyano Salvago



Fdo.:Ana Mª Molina López

A Cristina

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero mostrar mi más sentido agradecimiento al Departamento de Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Córdoba, en especial a la Dra. Dña. Rosario Moyano Salvago y Dra. Dña. Ana Molina López, directoras de esta tesis doctoral, ya que sin su orientación y apoyo esta tesis no hubiera sido posible.

Me gustaría resaltar la labor de Dr. D. Alfonso Blanco Rodríguez por la forma tan entusiasta de transmitir sus conocimientos y la capacidad de interpretar todo lo que se puede ver a través de un microscopio extrapolándolo a cada área científica. Es un ejemplo a seguir ya que hace de su trabajo su forma de vida, y lo más importante, la pasión con lo que lo hace y ver como disfruta con ello.

A todo el personal del Servicio de Animales de Experimentación (SAEX) y del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI), al personal del Dpto. de Farmacología, Toxicología y Medicina Legal y Forense de la UCO, por su inestimable ayuda y orientación durante toda la fase experimental de esta Tesis.

Por otro lado agradecer a mi familia en general por su apoyo, especialmente Cristina, y a mis padres, Paqui y Joaquín, por ser ese impulso constante, que me ha ido manteniendo desde pequeño, a ellos les debo todo lo que soy hoy en día.

Índice

Índice

1. Introducción	1
2. Objetivos	11
3. Revisión bibliográfica	15
3.1. Introducción	17
3.2. Bisfenol A	20
3.2.1. Propiedades Físico-Químicas del Bisfenol A	20
3.2.2. Usos industriales y relación con el medio ambiente	24
3.2.3. Migración a los alimentos	40
3.2.4. Exposición	42
3.2.5. Bioacumulación y biomagnificación.....	49
3.2.6. Metabolismo.....	50
3.2.7. Efectos sobre la salud humana	53
3.2.8. Biomonitorización	66
3.2.9. Legislación	69
3.3. Tejido muscular Esquelético.	71
3.3.1. Mecanismo de la contracción muscular.....	75
3.3.2. Regulación de la contracción muscular.....	77
3.3.3. Fibra muscular	78
3.3.4. Procesos patológicos.	80
3.3.5. El uso de monocitos modulares	83
4. Material y métodos	101
4.1. Animales utilizados	103
4.2. Protocolo y diseño experimental	105
4.3. Toma de muestras	106
4.4. Obtenciones y evaluaciones de los cultivos de monocitos (CMNs)	108
4.4.1. Aislamiento de células Mononucleadas derivadas de Médula Ósea.....	108

4.4.2. Aislamiento y expansión de Células Mesenquimales derivadas de tejido Adiposo de donantes sanos	109
4.5. Caracterización morfológica de células mononucleadas y células mesenquimales.....	112
4.5.1. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión	113
4.5.2. Caracterización por microscopía electrónica de barrido ...	114
4.6. Estudio histopatológico estructural y ultraestructural	116
4.6.1. Microscopio óptico	116
4.6.2. Microscopio electrónico de transmisión (MET)	123
4.7. Técnicas histoenzimáticas	126
4.8. Estudio morfométrico	132
4.9. Análisis estadístico	139
5. Resultados	141
5.1. Grupo control.	143
5.2. Grupo BPA.	156
5.3. Grupo retirada BPA.....	164
5.4. Grupo CNMs.....	171
6. Discusión	197
7. Conclusiones	223
8. Resumen / Summary.....	229
9. Bibliografía	223
Anexo	259

1. Introducción

1. Introducción

Son numerosos los contaminantes ambientales que pueden actuar como disruptores endocrinos (EDCs) modificando el equilibrio del sistema endocrino y esquelético, se han multiplicado el número de estudios científicos implicados en la investigación de los mecanismos de acción tóxica de estos compuestos y las repercusiones que tienen sobre el medio ambiente y la salud (Mandich et al 2007; Gimenez et al., 2016; Molina et al., 2013; Lora et al., 2016; Barasona et al., 2017).

La mayoría de estas sustancias con actividad endocrina generan sus efectos como consecuencia de su acción por la similitud estructural que poseen con las

hormonas esteroideas siendo capaces de provocar, en las células diana, una respuesta parecida a las de las hormonas endógenas o bien inhibir dicha respuesta ejerciendo un efecto antagónico, por ello, los compuestos más estudiados son aquellos capaces de mimetizar los efectos de los andrógenos y los estrógenos sobre el organismo.

El Bisfenol A (BPA), es un conocido disruptor endocrino, presente en una gran variedad de productos de consumo, de los cuales un elevado número de ellos entran en contacto directo con el alimento, tales como envases de bebidas, o en el recubrimiento interno protector de las latas de conservas entre otros, siendo además utilizado en múltiples bienes de consumo no alimenticios, tales como sellantes dentales, equipos y material médico, lo que podría llegar a constituir un problema de salud pública.

El Bisfenol A (BPA) es un compuesto, con actividad como disruptor endocrino, que es utilizado habitualmente como componente de plásticos y envases de alimentos. Cambios en el pH, abrasiones mecánicas y el calor pueden acelerar la hidrólisis del enlace éster que une las moléculas de BPA en el policarbonato plástico, pudiendo producir que se libere fácilmente llegando al alimento y/o ambiente. (Vandenberg et al., 2007; Mileva et al., 2014).

Existen distintas vías de exposición a los contaminantes que se encuentran en el medio ambiente siendo la vía inhalatoria y la ingesta alimentaria dos de las más

estudiadas (Zhuang et al., 2016; Kan et al., 2017; Leyssens et al., 2017; Lyu et al., 2017; Xue et al., 2017). Parte de estos compuestos que participan activamente en la contaminación ambiental pueden actuar como disruptores endocrinos sobre los organismos vivos.

La importancia del BPA como contaminante medioambiental y el riesgo que conlleva debido a su baja tasa de biodegradación y su bioacumulación en la cadena trófica han llevado al Parlamento Europeo a incluirlo como una sustancia cuya toxicidad debería evaluarse.

La Comisión Europea y los Estados Miembros decidieron restringir el uso de BPA en la fabricación de biberones de plástico para lactantes (Directiva 2011/8/UE) a partir del 1 de marzo de 2011, prohibiéndose tanto la comercialización como la importación de los mismos a partir del 1 de junio del mismo año (Reglamento de Ejecución (UE) 321/2011). Francia y Dinamarca de forma unilateral, ya prohibieron la fabricación y la comercialización de biberones que contuvieran BPA. Además, el uso de BPA en materiales en contacto con alimentación infantil de entre 0 y 3 años, está prohibido en Canadá, Australia y en varios estados de Estados Unidos. Por otra parte, desde el año 2015, ha quedado prohibido en Francia el uso de BPA en materiales que entren en contacto con cualquier tipo de alimento.

La utilización del BPA en envases en contacto con los alimentos está permitida en el resto de la Unión Europea mediante el Reglamento Europeo (UE) 10/2011 de la

Comisión de 14 de enero, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los productos alimenticios, en el cual se establece un límite máximo de migración para esta sustancia de 0,6 mg/kg. El valor de la Ingesta Diaria Tolerable (IDT) del BPA ha sido modificado en el último informe realizado por la EFSA en el 2015, y ha pasado de 50 µg/kg pc/día a 4 µg/kg pc/día (EFSA, 2015). En referencia al análisis de la exposición del BPA realizado por la EFSA, éste concluye que la exposición dietética no supera el valor de IDT para ningún grupo de edad, ya que los niveles calculados se encuentran 34 veces por debajo del valor de IDT. Pero, por otro lado, también se hace referencia y se apunta a que la evaluación de incertidumbre y debe ser estudiada (EFSA, 2015). La IDT se ha hecho temporal para dar cuenta de la incertidumbre sobre los posibles efectos del BPA en la glándula mamaria, sistema reproductivo, neurológico, sistemas inmunológicos y metabólicos en animales de laboratorio.

En diciembre de 2016, la Comisión Europea decidió restringir el uso de BPA en el papel térmico en la Unión Europea. Esta prohibición será efectiva en el año 2020, habiéndose establecido como alternativa el uso de Bisfenol S (BPS).

En junio de 2017, el BPA ha sido incluido por la Unión Europea (ECHA) dentro de la lista de químicos altamente preocupantes debido a sus propiedades, y a que causa serios efectos en la salud humana, se ha establecido que todos los fabricantes, importadores y suministradores de BPA deben clasificar y etiquetar todas las mezclas

que contengan BPA como tóxico para la reproducción, categoría 1B para el 1 de marzo de 2018.

Actualmente, el límite de migración permitido en juguetes para niños es de 0.1 mg/l de BPA. En mayo de 2017, la Comisión Europea publicó una directiva (Directiva 2017/898) para disminuir ese límite a 0.04mg/l. Este nuevo límite debe establecerse en 2018.

Por otra parte, en abril del 2008 el Programa Nacional de Toxicología de los EEUU publicó un informe preliminar sobre el BPA en el que consideró prudente aumentar el margen de seguridad y establecer nuevos estudios sobre la evaluación del riesgo. La EFSA revisará su IDT después de evaluar todas las evidencias científicas-toxicológicas publicadas desde el 2012, y se estima que comience en 2017, cuando un estudio de dos años llevado a cabo por el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos esté disponible.

El término disruptor endocrino, puede definirse como todo agente exógeno (químico o físico) capaz de inducir efectos adversos para la salud de un organismo intacto o su descendencia, como consecuencia de cambios en la función endocrina. (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Yeung et al., 2011). Para ello el perturbador hormonal interfiere con la síntesis, secreción, transporte, unión, o metabolismo de las hormonas, que el organismo sintetiza fisiológicamente, y que son responsables del mantenimiento de la homeostasis y de la regulación de la reproducción, del desarrollo,

y/o del comportamiento. Incluye a cualquier agente que induzca alteraciones sobre cualquier aspecto de la actividad y desarrollo del sistema endocrinológico.

Bajo este término se engloba un gran número de compuestos químicos (plaguicidas, metales pesados, polímeros sintéticos y plásticos, derivados industriales) y de agentes físicos, como son las radiaciones de baja frecuencia, por tanto, el catálogo de perturbadores endocrinos es muy amplio, comprendiendo desde sustancias que se encuentran de forma natural en el medio ambiente y/o en los alimentos, hasta productos químicos, resultado de la acción antropogénica (Olea-Serrano, 2006).

La actividad del BPA como disruptor neuroendocrino ha sido muy estudiada por diversos grupos de investigación en distintas especies (Mandich et al., 2007; Rodríguez et al., 2010; López-Casas et al., 2012; Molina et al., 2013; Lora et al., 2016), siendo fundamentalmente su interferencia en la reproducción la más ampliamente evaluada. Además de su acción deletérea a nivel gonadal se ha observado que puede tener, entre otros efectos, acción sobre la diabetes tipo 2, obesidad, función hepática, alteraciones cardiovasculares, estrés oxidativo e inflamación e incluso a nivel del sistema musculotendinoso (Vandenberg et al., 2013; Rochester, 2013; Giménez et al., 2016).

En los últimos años ha sido muy estudiado en procesos de recuperación de los músculos y tendones lesionados por traumatismo y cortes a los que se les ha aplicado

factores de crecimiento, en cambio, apenas se han evaluado tratamientos paliativos de degeneraciones musculares y tendinosas, provocadas por sustancias exógenas, con factores de crecimiento (Cunha et al., 2014; Giménez et al., 2016; Bellido et al., 2017).

El tratamiento con monocitos medulares se ha extendido recientemente en diferentes especialidades médicas en todo el mundo. En medicina y traumatología deportiva, donde siempre se buscan los tratamientos más novedosos, se ha acogido con gran esperanza para el tratamiento de múltiples patologías. Es un tratamiento que ha recibido además gran atención por los medios de comunicación, creando expectativas sobredimensionadas en los pacientes que no siempre se corresponden con la realidad.

El presente trabajo de investigación consta de tres fases diferentes, en primer lugar estudiaremos las alteraciones que el BPA produce en las fibras musculares, y de forma paralela, analizaremos las modificaciones que acontecen en los fibrocitos y fibras de colágeno. En segundo lugar y una vez retirado el tratamiento con BPA, estudiaremos como evolucionan estas lesiones, y por último evaluaremos si los factores de tratamiento paracrinós que actúan por acción directa sobre las fibras musculares y conectivas puedan provocar una recuperación de las mismas.

La acción del BPA sobre las fibras musculares pueden ser reversibles, por lo que son diversos los estudios existentes de uso de tratamiento con monocitos para la

recuperación de las fibras. Debido a la actuación beneficiosa producida en los procesos degenerativos en general y musculares en particular de las sustancias paracrinas de los monocitos de medula ósea, se están utilizando en estas alteraciones, y el uso de los monocitos se realiza en altas dosis por vías sanguíneas o tratamientos directos de la zona que se pretende estudiar, y también se recomienda ambos tratamientos a la vez.

2. Objetivos

2. Objetivos

En este estudio nos proponemos evaluar la acción regeneradora en tejido muscular alterado por la acción del bisfenol A mediante la aplicación de monocitos medulares.

El objetivo fundamental de esta investigación es conocer el tipo de lesiones musculares, a nivel de microscopía y morfometría, que se producen en cerdos minipig dañados con bisfenol A, y una vez definidos los procesos degenerativos, abordar sus recuperaciones mediante reposo y lo que nos resulta más atractivo, con tratamiento mediante monocitos medulares

Para ellos hemos dividido la investigación en tres fases diferentes, que corresponden con un grupo control y con tres grupos experimentales diferentes.

Entre los principales **objetivos** de forma general que se persiguen son:

1. Estudiar la acción del Bisfenol A sobre el musculo esquelético en minipig como modelo experimental, comprobando las posibles alteraciones que producen a nivel de la fibra muscular.
2. Comprobar si el tipo de lesión que se produce por acción de BPA es de tipo reversible y el músculo recuperaría su morfología y funcionalidad tras un periodo de retirada de este disruptor..
3. Evaluar la acción de los monocitos medulares, estudiando sus efectos de recuperación de las fibras musculares.
4. Comprobar si la actuación de los monocitos medulares actúan a nivel de los mioblastos o bien sobre las células maduras.

Para ello, se utilizarán técnicas histopatológicas, tanto de Microscopia Óptica como Electrónica de transmisión, así como estudios morfométricos e histoenzimológicos.

3. Revisión bibliográfica

3. Revisión bibliográfica

3.1. Introducción

El Bisfenol A (BPA) es uno de los principales componentes del plástico, compuesto que ha adquirido una especial relevancia en las últimas décadas, debido a sus efectos sobre la salud de la población humana y animal, ya que puede actuar como disruptor endocrino. El BPA es una sustancia química utilizada, entre otros, en la fabricación de envases de alimentos, se ha comprobado su presencia como contaminante alimentario, debido entre otras causas, a la migración desde estos envases. Los plásticos producidos con BPA también tienen otras aplicaciones como son: la fabricación de CDs o DVDs, papel térmico, juguetes, dispositivos médicos, etc.

Los problemas de contaminación alimentaria y ambiental que genera, hace que la población se encuentre expuesta de forma inadvertida y continuada a este compuesto, conllevando un elevado peligro para la salud, especialmente en la población de riesgo como pueden ser las embarazadas, neonatos, y población infantil.

La exposición al BPA esta asociada a la diabetes, la obesidad, la infertilidad, alteraciones en el desarrollo, el cáncer de mama o de próstata, los problemas cardiovasculares, las alteraciones musculoesqueléticas, en el desarrollo neurológico y cerebral y a los trastornos del comportamiento, y por ello cada vez existe una mayor regulación.

La ECHA (Agencia Europea para Sustancias y Preparados Químicos) el 17 de junio de 2017, confirmó que el BPA es una sustancia con propiedades de alteración endocrina y con probables efectos graves para la salud humana, generando un nivel de preocupación similar al de las sustancias carcinogénicas, mutagénicas y tóxicas para la reproducción (CMR categoría 1A o 1B), por lo que es necesario continuar con los estudio de sus efectos sobre la salud, la evaluación de su toxicidad y la estimación del riesgo, teniendo en especial consideración a las poblaciones de riesgo.

El tratamiento con Plasma Rico en Plaquetas, PRP, y de monocitos medulares se ha extendido recientemente en diferentes especialidades médicas en todo el mundo, aunque se describió hace más de veinte años en cirugía maxilofacial y odontología. Consiste en la aplicación de plasma autólogo con una concentración

suprafisiológica de las plaquetas, que son activadas para que liberen los factores de crecimiento y sustancias activas de sus gránulos α . El objetivo de esta terapia es favorecer, estimular o iniciar el proceso de cicatrización, regeneración o curación del tejido dañado, aplicándose localmente de forma ambulatoria o bien como complemento a una técnica quirúrgica. En medicina y traumatología deportiva, donde siempre se buscan los tratamientos más novedosos, se ha acogido con gran esperanza para el tratamiento de múltiples patologías. Es un tratamiento que ha recibido además gran atención por los medios de comunicación, creando expectativas sobredimensionadas en los pacientes que no siempre se corresponden con la realidad. Es un tema controvertido en la comunidad médica debido a que ha habido una amplia implantación de su uso clínico en diferentes especialidades a pesar de que no hay demasiados estudios de laboratorio previos, y son escasos los estudios clínicos con alto nivel de evidencia científica que demuestren su eficacia. Existen opiniones de expertos a favor y en contra del uso de esta terapia. La ausencia de regulación por ninguna normativa y la falta de estandarización del proceso es un hándicap en la investigación y comparación de resultados.

3.2. Bisfenol A

3.2.1. Propiedades Físico-Químicas del Bisfenol A

El 2,2-bis (4-hidroxifenil) propano o bisfenol A (BPA) posee un número de identificación registrado (CAS): 80-05-07, su estructura química consiste en 2 núcleos fenólicos (Fig. 1), que le dan unas características físicas propias a este compuesto: una sustancia sólida, incolora e inodora a temperatura ambiente (Buysch., 1999).

La pureza del BPA suele ser del 99-99,8% (European Union Risk Assessment, 2003), según el fabricante y éstas impurezas incluyen fenol (<0,06%), orto y para isómeros de BPA (<0,2%) y agua (<0,2%).

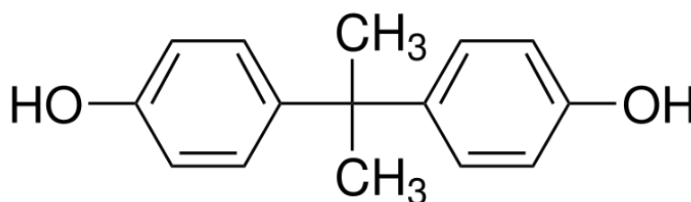


Figura 1. Fórmula química del BPA.

La clasificación y etiquetado del BPA fue elaborada por la European Union Risk Assessment en el año 2003 y actualizada en el año 2008, donde quedó descrita la clasificación del mismo como la siguiente:

Clasificación: Reproducción categoría 3; R62; Xi; R37- 41, R43	
R62:	posible riesgo para la fertilidad.
Xi:	Irritante.
R37:	irritante para el sistema respiratorio.
Categoría 3:	sustancias que causan preocupación en relación a la fertilidad humana en base a apropiados estudios animales.
R41:	riesgo de serio daño para los ojos
R43:	puede causar sensibilización por contacto con la piel.

El BPA es uno de los productos químicos producidos en mayor volumen en todo el mundo. Es preparado por la condensación de la acetona, de ahí el sufijo “-A” con dos equivalentes de fenol (Fig. 2). La reacción es catalizada por un ácido fuerte o una resina de poliestireno sulfonado, utilizándose una gran cantidad de fenol para asegurar su completa condensación.

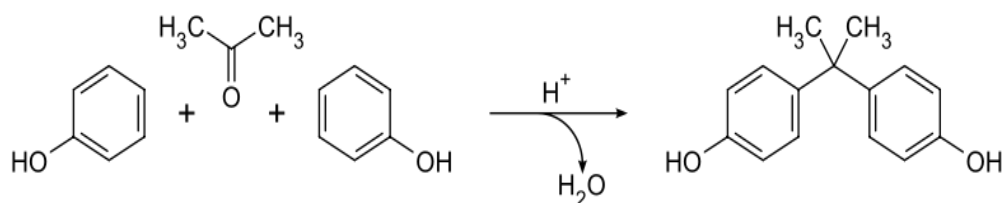


Figura 2. Reacción de condensación del BPA (Uglea y Negulescu., 2005).

Un gran número de cetonas sufren reacciones análogas de condensación. Este método es eficiente y el único producto derivado es el agua (Fiegue et al., 2002).

En cuanto a los embalajes, existen siete tipos de plásticos usados para embalar. Algunos plásticos del tipo 7, como el policarbonato (algunas veces identificado con las letras 'PC' al lado del símbolo de reciclaje) y las resinas epoxi, están hechos de BPA (Fiegue et al., 2002; Biello, 2008). Los plásticos tipo 3 (PVC) también pueden contener BPA como antioxidante en plastificantes (Fiegue et al., 2002).

Con respecto a las principales propiedades físico-químicas del BPA y sus valores están presentes en la tabla 1.

PARÁMETRO	VALOR
Peso molecular:	228.29
Fórmula molecular:	C ₁₅ H ₁₆ O ₂
Solubilidad en agua:	300 mg/l

PARÁMETRO	VALOR
Punto de fusión:	155-157°C, dependiendo del proceso de fabricación
Punto de ebullición:	360°C a 101.3 kPa (también puede ocurrir descomposición)
Presión de vapor:	$5,3 \times 10^{-9}$ kPa
Densidad relativa:	1.1-1.2 kg/m ³
Límite de explosividad:	La mínima concentración explosiva es 0.012 g/l con una concentración de oxígeno > 5%
Propiedades oxidantes	No es un agente oxidante
Log KOW	3,40
Constante de la ley de Henry	$4,03 \times 10^{-6}$ Pa.m ³ /mol ¹
Log KAW	-9,01 ²
Log KOA	12,41 ³
pKA	9,59-11,30

Tabla 1. Propiedades físico-químicas del BPA a 25°C (Cousins et al., 2002, DLEP 60,2011).

¹ Calculado como el ratio del vapor de presión (Pa) y la solubilidad en agua (mol/m³).

² Calculado de la constante de la ley de Henry (H), i.e., $K_{AW} = H/RT$, donde R es la constante de los gases (J/mol/K) y T es la temperatura absoluta (K).

³ Calculado del ratio K_{OW}/K_{AW} .

3.2.2. Usos industriales y relación con el medio ambiente.

3.2.2.1. Usos industriales

El BPA se utiliza como un elemento y/o componente destinado principalmente a la fabricación de plásticos de policarbonato y resinas epoxi (Mileva et al., 2014). El policarbonato y las resinas son materiales dirigidos a la producción de objetos y recipientes destinados a entrar en contacto con los alimentos y bebidas, como pueden ser envases, recubrimientos de conservas, platos, tazas, platos de microondas, botellas de plástico, copas, latas, etc. Los plásticos producidos con BPA también tienen otras aplicaciones como son la fabricación de CDs o DVDs, papel térmico, dispositivos médicos, gafas de sol, etc. (Vandenberg et al., 2007).

USO	Tm/año	Consumo en la UE (en %)
Producción de policarbonato	486,880	71.1
Producción de resinas epoxi	171,095	25.0
Resinas fenoplásticas	8,800	1.3
Producción de resinas de poliéster insaturado	3,000	0.4
Revestimiento de latas de conserva	2,460	0.4
Producción y proceso de PVC	2,250	0.3
Fabricación de bisfenol A alquiloxilado	2,020	0.3

USO	Tm/año	Consumo en la UE (en %)
Producción de papel térmico	1,400	0.2
Fabricación de polioles / poliuretano	950	0.1
Producción de poliamida modificada	150	<0.1
Fabricación de ruedas	110	<0.1
Líquido de frenos	45	<0.1
Otros usos menores	5,990	0.9

Tabla 2. Usos y consumos en la UE (EU RAR, 2002)

El BPA también se ha encontrado en el cloruro de polivinilo comercial (PVC) utilizado en películas y bolsas de plástico para alimentos, siendo posible su migración a estos (López-Cervantes y Paseiro-Losada, 2003; López-Cervantes et al., 2003). A raíz de su utilización para la fabricación de bolsas de plástico, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) pidió a la Asociación de Fabricantes de Plásticos en Europa investigar el uso del BPA en PVC. Tras esta investigación se dejó de aplicar el BPA en el proceso de polimerización del PVC por algunos fabricantes en la Unión Europea (UE), al igual que se investigó su uso como estabilizador/antioxidante en PVC.

Según algunos autores, el caucho natural o silicona que se usa para producir tetinas y chupetes de bebé podría contener BPA. Sin embargo, la Asociación Mundial de Fabricantes de biberones y tetinas afirmó que el BPA no

es y nunca ha sido utilizado en la fabricación de los mismos (Thomas y Dong, 2006).

El primero que publicó la síntesis del BPA fue Thomas Zincke de la universidad de Marburgo, Alemania (www.bisphenol-a.org). La información de la síntesis del BPA y de un número de compuestos relacionados fue publicada por primera vez en 1952. A pesar de que Zincke divulgó las características físicas predominantes del BPA (como la composición, punto de fusión o la solubilidad molecular en solventes comunes), no señaló ningún uso industrial. Sin embargo, ya en 1953, el Dr. Hermann Schnell, de la empresa Bayer en Alemania y el Dr. Dan Fox de General Electric en los Estados Unidos desarrollaron procesos de fabricación para un nuevo material plástico, el policarbonato, usando el BPA como materia prima. Este plástico de policarbonato tendría una serie de características muy útiles, particularmente claridad óptica, alta resistencia a temperaturas extremas ($-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ y cerca de $145\text{ }^{\circ}\text{C}$) y a los golpes, que harían que éste policarbonato formara parte importante de la vida cotidiana con una gran variedad de usos. Su comercialización se inició en 1957 en los Estados Unidos y en 1958 en Europa, y al mismo tiempo, las resinas epoxi fueron desarrolladas para resolver una amplia gama de necesidades industriales (www.bisphenol-a.org).

Debido a sus extensos usos, el BPA se estimó en 2008 en una producción mundial anual de más de 5.16 millones de toneladas, y de forma muy extendida, según datos de la Chemical Weekly del 1 de septiembre de 2009 (Chemical Weekly, 2009), siendo Asia el principal productor de BPA, seguido por Europa (Tabla 3).

REGIÓN	CAPACIDAD <i>Kilotoneladas por año</i>	DEMANDA
America	1226	972
Europa	1438	1040
<u>Asia</u>		
China	261	651
Japón	615	415
Korea	345	336
Taiwan	645	341
Otras ciudades	480	550
Total Asia	2346	2293
Otros	150	74
TOTAL	5160	4379

Tabla 3. Producción y demanda global de BPA durante el año 2008
(Chemical Weekly 2009)

En 2010 la estimación de la producción anual mundial de BPA ascendió a 8 millones de toneladas, y aproximadamente 100 toneladas pudieron ser liberadas a la atmósfera (Vandenberg et al., 2010).

Cerca del 70% del BPA producido en la industria se utiliza para fabricar policarbonatos y aproximadamente un 25% se utiliza en la producción de resinas epoxi (Kamrin, 2004). El 5% restante se utiliza en una amplia variedad de productos, incluyendo resinas fenólicas, resinas no saturadas de poliéster, recubrimiento de latas, como antioxidante e inhibidor final de la polimerización en la fabricación de polivinilos (cloruro de vinilo) plásticos, como intermediario en la fabricación de papel térmico (Kamrin, 2004), fabricación de neumáticos de coche o retardadores de llama (European Union Risk Assessment Report, 2003).

Tal y como representa la Fig. 3, durante el año 2015, Asia consumió el 56% del total de BPA generado en el mundo, consumiendo entre Norte América y Europa occidental un 36% adicional, lo que supone un total entre estas tres regiones mayoritarias de alrededor del 92% del BPA producido.

Se espera que el consumo mundial de BPA crezca una media anual del 3% hasta el año 2020, siendo este crecimiento esperado del 5% anual en el norte de Asia, donde el crecimiento será mayor (IHS 2016)

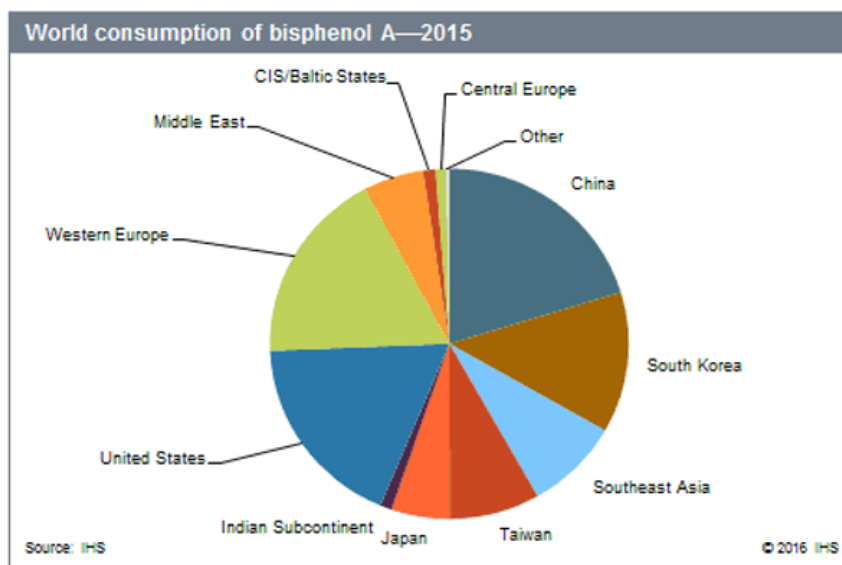


Figura. 3 Distribución del consumo mundial de BPA durante el año 2015 IHS-CEH (IHS Markit- Chemical economics handbook)

En muchos casos, el nivel de producción de BPA de los distintos países no se corresponde de manera proporcional con el nivel de consumo del mismo, tal y como muestra la Fig. 4, siendo Inglaterra o Francia países con un elevado consumo del mismo a pesar de tener una producción mínima o nula. España se encuentra dentro de los 4 principales productores de BPA a nivel europeo a pesar de tener un consumo reducido respecto a otros países europeos como Alemania, Francia o Reino Unido.

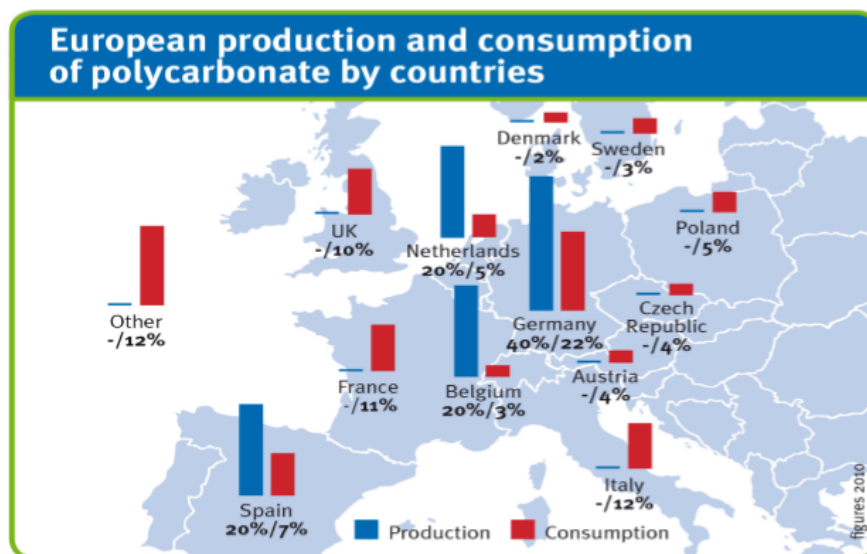


Fig. 4. Comparativa entre los niveles de producción y uso de policarbonato en Europa (IHS-CEH)

▪ Policarbonato

El policarbonato comercialmente más importante, es el BPA policarbonato, que se produce convencionalmente por policondensación del BPA con fosgeno. Sin embargo, el fosgeno es un producto químico muy tóxico. Por ello, a mediados de los años 90, fue desarrollado comercialmente un nuevo proceso, en el que el BPA reacciona con el difenilcarbonato, para producir el policarbonato sin la necesidad del fosgeno como materia de base (Bishop., 2000). Debido a las características únicas del policarbonato de BPA, como su dureza extrema, la resistencia al

impacto, una transparencia excepcional, la compatibilidad excelente con varios polímeros, y la resistencia a la distorsión a temperaturas altas (Serini., 2001), se ha utilizado extensamente en una variedad de productos de consumo, incluyendo un gran número de productos que entran en el contacto con el alimento, tales como envases de bebidas retornables o botes de alimentación infantil. Además, se utiliza en bienes de consumo no alimenticios, tales como lentes de gafas, equipos eléctricos, electrodomésticos, y equipos de seguridad deportiva, CDs y DVDs, papel térmico, dispositivos médicos, gafas de sol etc (Kamrin., 2004; Vandenberg et al., 2007)

- **Resina epoxi**

Las resinas epoxi son prepolímeros que contienen grupos epóxido. Éstas se forman generalmente por reacción de bisfenol A diglicidil-éter (BADGE) con BPA (Runyon et al, 2002). Industrialmente, la reacción de estas resinas con una variedad de agentes endurecedores (como anhídridos, aminas alifáticas, o poliamidas) produce plásticos reticulados o termoendurecibles. Debido a su dureza, resistencia química, y características adhesivas y eléctricas, las resinas epoxi y las resinas epoxi modificadas se utilizan actualmente en recubrimiento y usos estructurales. La resina epoxi también tienen un número de usos que implican el contacto con el alimento. Particularmente, estas resinas son parte de las envolturas

protectoras usadas en las latas de alimento y de bebida, y se pueden también utilizar en el campo de los transformados alimenticios, por ejemplo, en las capas aplicadas a las superficies interiores de algunas cubas usadas en la elaboración del vino (Kamrin., 2004).

En usos estructurales pueden cubrir una variedad de productos tales como fibras reforzadas, laminados eléctricos, bastidores, herramientas, y pegamentos. Otros usos incluyen pinturas, suelos, pegamentos, tarjetas de circuitos impresos y **sellantes** dentales (Kamrin., 2004; Wen-Tien., 2006).

3.2.2.2. Fuentes de Exposición

Cada año, se utilizan más de 2 millones de toneladas de BPA en la fabricación de una gran variedad de productos domésticos (Lee et al., 2008; Vandenberg et al., 2009). El BPA está presente en los envases de alimento de policarbonato plástico y de bebida, en los biberones, así como en el recubrimiento de las latas de bebida y de alimento, o en los sellantes dentales utilizados en odontología (Vom Saal y Myers, 2008).

La exposición humana al BPA es extensa como se ha comprobado en el análisis de muestras de orina humana (Matsumoto et al., 2003; Yang et al., 2003; Calafat et al., 2005; Kawaguchi et al., 2005; Liu et al., 2005; Ye et al.,

2005, Bushnik et al., 2010; Covaci et al., 2015). Bushnik et al. (2010) detectaron BPA en el 91% de las muestras de orina recogidas a diferentes individuos de distintas edades residentes en Canadá, con una concentración media de 1.16 µg/l, presentando los niños entre 6 y 11 años una concentración de BPA en orina superior a grupos de otros rangos de edades; por otra parte Covaci et al. (2015) muestrearon 674 parejas de madres e hijos en 6 países Europeos obteniendo valores medios de BPA en orina de 2.04 µg/l en las madres y 1.88 µg/l en los niños, siendo el consumo de comida enlatada y la clase social (representada por un mayor nivel académico de la familia) los principales parámetros predictivos de los niveles de BPA en orina en las madres y sus hijos, estando estrechamente correlacionado el nivel de BPA entre ellos ($r=0.265$, $p<0.001$), lo que sugiere la presencia de un factor común que influencia este biomarcador en ambos.

Aunque el consumo diario de BPA en humanos puede ser considerablemente menor que las referencias de ingesta diaria tolerable, o los niveles de migración del BPA menores que los límites fijados por las diferentes agencias y países, varios estudios han sugerido un efecto endocrino adverso para el BPA a dosis de sólo 0,02-0,20 µg/kg/día tales como disminución de la producción diaria de esperma e infertilidad en varones a dosis de 0,2 µg/kg/día (Vom Saal et al., 1998; Chitra et al., 2003), estímulo del desarrollo de la glándula mamaria a dosis de 0,025 µg/kg/día (Markey et al., 2001), una

disminución de enzimas antioxidantes a 0,2 µg/kg/día (Chitra et al., 2003) y alteraciones persistentes en el desarrollo peripuberal de la glándula mamaria a dosis de 0,025-0,25 µg/kg/día (Muñoz de Toro et al., 2005).

Las rutas posibles de exposición para los miembros de la población en general se pueden dividir en (1) la exposición ambiental directa e indirecta debido a la liberación de BPA durante su producción, uso y disposición; (2) exposición a través de los envases al alimento; y (3) el contacto con o la inhalación de productos de consumo no en contacto con el alimento.

Según el Programa Nacional de Toxicología, la exposición al BPA es probablemente casi exclusiva a través del alimento (National Toxicology Program, 2007). Por ejemplo, Wilson et al. (2007) examinaron la exposición al BPA y a otros fenoles en 275 niños de 1,5-5 años de edad, concluyendo que el 99% de la exposición al BPA era dietética basándose en medidas de los niveles de BPA de una variedad de fuentes tales como el alimento, el aire, y el polvo de sus hogares. Miyamoto y Kotake (2006) concluyeron que el 95% del BPA en el varón adulto era procedente del alimento y de la bebida, exceptuando el agua.

Las medidas y el conocimiento ambiental de las características del BPA sugieren que las fuentes ambientales de exposición de BPA no contribuyen perceptiblemente a la exposición de la población total (European Union Risk

Assessment, 2003). Así, la mayor preocupación está puesta sobre la exposición a través del alimento (National Toxicology Program, 2007) particularmente en los niños que pueden ser expuestos por migración del BPA a la leche en los biberones de policarbonato y la migración del BPA en fórmulas alimenticias infantiles a través de las capas de resina epoxi de los envases que contienen el alimento (Kamrin et al., 2004). En fórmulas infantiles consumidas por los niños (listas para utilizar, en concentrado o en polvo), Environment Canada apoya la conclusión de que la migración del BPA es significativa sólo para las fórmulas infantiles líquidas (Environment Canada, 2008). El BPA fue detectado y cuantificado en todas las muestras, con unas concentraciones de 2,27 a 10,2 ppb (Cao et al., 2008).

Además de fuentes comerciales de alimento, los niños consumen la leche materna. Nakao et al. (2015) analizaron muestras de leche materna de 19 madres Japonesas determinando unos niveles de BPA que oscilaban entre los 1,4 y 380 ng/g con un valor medio de 36 ng/g, Zimmers et al. (2013) detectaron BPA libre en el 62% de las muestras de leche materna obtenidas de 21 mujeres lactantes de EEUU obteniendo unos resultados que oscilaban entre 0,22 y 10,80 ng/ml con un valor medio de 3,13 ng/ml, encontrando además diferencias significativas entre razas, que fueron atribuidas a diferencias en el estilo de vida y el metabolismo. Mendoca et al. (2014) también midieron concentración de BPA libre en muestras de leche de 27 madres, así como los

niveles de BPA en la orina de 31 niños lactantes siendo positivas a BPA el 75% de las muestras de leche y el 93% de las muestras de orina y obteniendo unos niveles medios de 0,4-1,4 ng/ml en leche y de 1,2 a 4,4 ng/ml en orina.

Como hemos comentado, hasta hace poco tiempo, la mayor parte de la exposición al BPA se pensaba que se producía a través de la dieta y que el organismo lo metabolizaba y eliminaba rápidamente. Sin embargo, en el estudio de Stahlhut et al. (2009), utilizando 1469 personas, se comprobó que el período de eliminación del BPA en la mayoría de la población era mucho mayor que el esperado, basado en estudios publicados de exposición aguda, incluso en personas que habían ayunado durante horas, demostrándose una larga vida media del BPA en el organismo humano. Esto sugiere la posibilidad de una importante exposición no alimenticia y requiere la necesidad de investigar esas fuentes de exposición no alimenticias como los cosméticos, el polvo y el aire de los hogares, los juguetes, chupetes, el agua superficial de las piscinas o los sellantes dentales, que presentan unas concentraciones de BPA más bajas pero que se recogen dentro de las fuentes de exposición tanto orales como dérmicas (Von Goetz et al., 2017). De igual modo, el BPA está presente en la fabricación de tuberías, botellas, tetinas, equipamiento médico, equipos electrónicos y CDs y DVDs (Huang et al., 2012). El BPA también se utiliza como estabilizante y antioxidante en la producción del cloruro vinílico (Nam et al., 2010) y en la producción de papel térmico, que presenta una alta

concentración de BPA y que supone una fuente dérmica de exposición importante (Von Goetz et al., 2017). El papel térmico se produce en cantidades masivas ya que se utiliza en los tickets de compra, libros, faxes y etiquetas, así como tras su reciclado, en folletos, sobres de correo, periódicos, rollos de cocina, papel higiénico y cajas de comida (Nam et al., 2010; Liao et al., 2012).

En productos de papel reciclado usados para la transformación de los alimentos el BPA se ha encontrado en concentraciones 10 veces más altas que las encontradas en los productos de papel no reciclado. Las concentraciones de BPA en el papel eran de hasta 26 µg/g (EFSA, 2006). Otro estudio reciente indicó que los niveles de BPA encontrados en orina de niños de la Unidad de Cuidados Intensivos en Neonatología, que requería la utilización de equipos médicos era entre 16 y 32 veces superior a los niveles encontrados en la población general (Duty et al., 2013). Observándose que el BPA está presente en una gran variedad de productos médicos (bolsas que contienen fluidos intravenosos, en la nutrición parenteral total y tubos asociados con su administración; tubos de mantenimiento nasogástrico, máscaras respiratorias, tubos endotraqueales y catéteres umbilicales) con lo que sería otra vía de exposición a tener en cuenta en recién nacidos (Calafat et al., 2009; Duty et al., 2013).

Otra fuente de exposición es el empleo del BPA en la fabricación de materiales sellantes o compuestos dentales (European Union Risk Assessment, 2003). El BPA puede presentarse potencialmente como impureza o liberarse durante la degradación de los materiales dentales. Durante los procedimientos dentales, las mezclas de resina se aplican como monómeros fluidos y son polimerizados in situ por la luz ultravioleta. Según la Unión Europea (European Union Risk Assessment, 2003), los pacientes pueden ser expuestos al BPA durante la etapa de la polimerización.

En un estudio sobre 20 individuos con al menos 6 piezas rellenas con material sellante a base de polímero con BPA y 20 individuos control sin ningún tipo de sellante dental aplicado se recogieron muestras de saliva para ser analizadas. Tras el tratamiento de las mismas se encontraron cantidades variables de BPA en ambos grupos, apareciendo niveles apreciables de BPA en 8 de las 20 muestras del grupo test y en 3 de las 20 muestras del grupo control, siendo significativamente mayores en el grupo donde se aplicó el sellante dental (Berge et al., 2017).

Recientemente se han realizado numerosos estudios sobre el papel térmico como fuente de exposición, debido a su alto contenido en BPA y a su gran cantidad de aplicaciones en la vida cotidiana. En un estudio realizado con 6 voluntarios que simulaban el trabajo de un cajero y la manipulación de los

tickets de papel térmicos durante el periodo de ensayo , se analizaron muestras de orina mediante cromatografía obteniendo concentraciones urinarias de BPA 3 veces superiores a las obtenidas antes del periodo experimental y se observó que tras 48 horas del final del periodo experimental, los niveles en orina de BPA no descendieron, sugiriendo que el periodo de excreción del BPA tras la entrada vía dérmica es superior a 48 horas (Lv et al., 2017).

Ndaw et al. (2016), determinaron el nivel de BPA en muestras de orina de 90 cajeros expuestos diariamente al contacto directo con el BPA presente en el papel térmico, analizando a su vez 44 controles para hacer posible la comparación. Los valores medios obtenidos tras el análisis van desde 3,54 µg/l en los individuos control a 8,92 µg/l en los individuos expuestos lo que supone un aumento significativo en la concentración total de BPA en orina de los cajeros que manipulan diariamente papel térmico. Estos resultados indican que la cantidad de BPA transferida a la piel tras la manipulación del papel térmico no debe ser infravalorada, particularmente para los cajeros.

Aun así, la mayor preocupación está puesta sobre la exposición a través del alimento, particularmente en los niños, ya que son más susceptibles a cualquier efecto nocivo del BPA. Pueden ser expuestos por la migración de éste en la leche de las botellas de policarbonato y de fórmulas de alimentos

infantiles conservados en envases de alimento recubiertos por resinas epoxi (Kamrin, 2004). Por ello nos vamos centrar en 1) la exposición por migración al alimento y 2) la exposición ocupacional.

3.2.3. Migración a los alimentos

▪ Migración desde policarbonatos

Se han realizado diversos estudios para determinar la migración de BPA desde los materiales y, en el caso de los policarbonatos (PC), se ha concluido que se puede producir la migración desde los mismos durante la difusión e hidrólisis de los polímeros. Sin embargo, la difusión tiene una menor relevancia. En el estudio realizado por Mercea et al. (2009), se observó que un descenso del pH en una solución se asociaba al aumento de la migración de BPA desde los policarbonatos al agua, mientras que la presencia de cationes en una solución (a temperatura ambiente) no afectaba de manera significativa a la hidrólisis. También se probó que la migración era más rápida en recipientes de policarbonato (como botellas de agua) que fueron agitadas durante unos años y se sometieron a temperaturas en aumento. Además, se descubrió que la tasa de migración hacia el contenido depende de las propiedades químicas del mismo. En una mezcla de etanol y agua, se produjo una migración más rápida en comparación con agua, mientras que en aceite de

oliva (que no afecta a la hidrólisis del PC) la migración del BPA fue despreciable.

Otro estudio realizado por Nam et al. (2010) evaluó la tasa de migración de BPA desde biberones nuevos y usados de forma repetida. Se observó que el incremento de temperatura y el uso prolongado propiciaban la hidrólisis del polímero causando una mayor migración. También se observó migración desde botellas nuevas con una concentración de 0,03 y 0,13 $\mu\text{g} / \text{dm}^3$ a 40 y 95°C, respectivamente. Tras 6 meses de uso, las concentraciones de BPA del agua aumentaron a 18 y 18,47 mg / dm^3 a 40 y 95 ° respectivamente. En otro estudio de Maia et al. (2011), se mostró como los detergentes disueltos en agua afectaban a la migración de BPA en biberones, retardando este efecto al lavar, cepillar o enjabonar los biberones de PC con agua con detergente.

Los resultados de estos estudios, entre otros, propiciaron que muchos países prohibieran el uso de materiales que contengan BPA para la fabricación de biberones. En el caso de España, esto se llevó a cabo con la modificación del Anexo II del Real Decreto 866 del 2008, mediante la Orden PRE/628/2011.

- **Migración del BPA desde la capa de laca de las latas**

La comida enlatada presenta una exposición significativa al BPA ya que se libera de la laca de las latas, la resina que recubre el interior de la lata se

usa para evitar la corrosión del metal. Estas lacas se fabrican con resinas epoxi, en las que se usa el diglicidil éter como componente prioritario. En estudios realizados se ha observado como la liberación de BPA era significativa y se estimó que iba desde 4 a 23 µg por lata (Vandenberg et al., 2007). En el estudio de Takao et al. (2002) se demostró que la temperatura que se usa para la pasteurización térmica (100 ° C) provocaba la liberación 18 veces más rápida desde el polímero. Además, concluyó que existe una relación entre la concentración de BPA liberado desde las latas y la temperatura de pasteurización de la comida enlatada. Se determinaron concentraciones bajas de BPA (0,06 ng/cm²) en comida enlatada que no había sido pasteurizada, mientras que cantidades significativamente superiores (21 y 32 ng/cm²) fueron halladas en latas que habían sido sometidas a temperaturas de 80 y 100 °C, respectivamente. Por último, se demostró que la cantidad de BPA liberado está determinada por el grado de polimerización de las resinas epoxi de las lacas y el uso de BPA como componente de primer orden en su producción.

3.2.4. Exposición

A medida que los países se han desarrollado, la demanda de equipamiento médico, objetos electrónicos, adhesivos, materiales de construcción, automóviles, etc... ha incrementado de forma global. Como resultado de esto, la producción y

consumo de BPA, ha aumentado de forma continua en las últimas décadas (Fig. 5). La producción global en 2012 de BPA fue de 4,6 millones de toneladas, siendo Asia el productor predominante con casi el 53% del volumen producido total (2,4 millones). Los siguientes productores son Europa y Norte América con el 25 y 18%, respectivamente. En cuanto a países, Estados Unidos, Taiwan, China, Corea del Sur y Japón son los cinco mayores productores, cuya producción conjunta supone más de 2,7 millones de toneladas (Fig. 6). Así, el crecimiento de la producción global anual se ha mantenido entre el 0 y el 5% (Flint et al., 2012; Corrales et al., 2015).

El vertido directo del BPA al medio ambiente se produce durante el procesado y manipulación de éste llegando al aire, agua y suelo, y/o a través de vertido directo al suelo. De esta forma, se ha detectado BPA en aire, polvo, suelo, agua (tanto de bebida como agua libre), sedimento, residuos industriales y municipales, y comida (Flint et al., 2012).

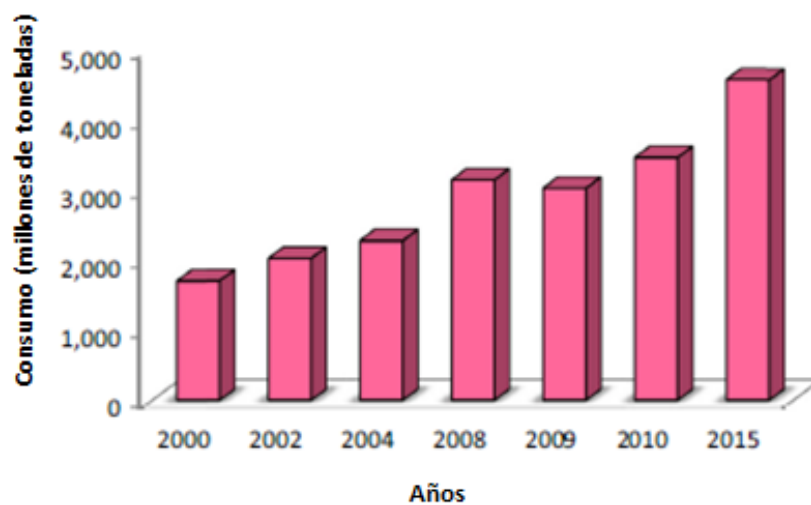


Figura 5. Consumo global de policarbonato desde 2000 al 2015 (Muhamad et al., 2016)

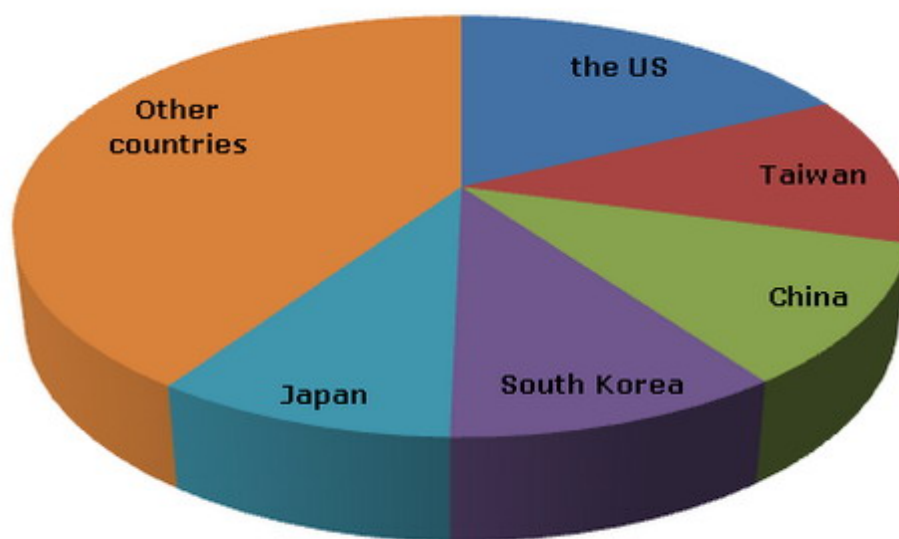


Figura 6. Producción global de BPA por países (Adaptado de Corrales et al., 2015)

En el último informe publicado por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) en el 2015, se realizó una evaluación de la exposición dietética del BPA. Las concentraciones más elevadas de BPA se encontraron en los alimentos y productos envasados, en comparación con los alimentos no envasados, donde la media mostró concentraciones de 18,68 µg/kg y 1,5 µg/kg de BPA, respectivamente (Fig. 7a). Las categorías de los alimentos envasados donde se observaron las concentraciones más relevantes de BPA fueron cereales, legumbres, carnes, pescados, condimentos, comida preparada, snacks y helados. Estas 7 categorías alcanzaban valores superiores a 30 µg/kg de BPA (Fig. 7b) (Juan-García et al., 2015).

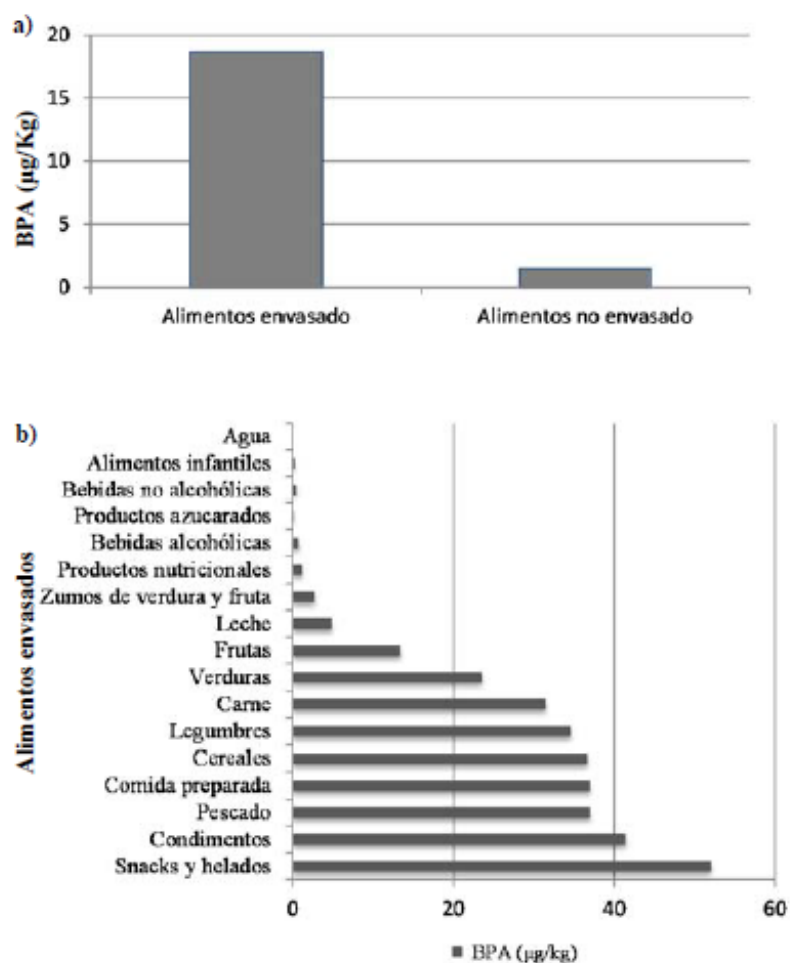


Figura 7. Presencia de BPA en productos envasados y no envasados (a); Grupos de alimentos envasados donde se observan las concentraciones más relevantes de BPA (b) (Juan-García et al., 2015).

3.2.4.1. Alimento y agua de bebida

La ingesta se considera la vía predominante de exposición humana a esta sustancia y esto se debe fundamentalmente al contacto de la comida con polímeros que la contiene, aunque también podría estar relacionado con la acumulación de BPA en el medio ambiente, y la exposición de los animales y plantas a este compuesto. En un estudio realizado por Vandenberg et al. (2007) estimaron que la exposición al BPA a través de la dieta en el caso de los humanos es diaria y que se produce en concentraciones entre 0,16-0,48 µg/kg/peso/día.

Como ya se ha mencionado previamente, el BPA tiene la capacidad de migrar desde los polímeros y resinas epoxi a la comida y agua de bebida. Algunos estudios detectaron concentraciones de BPA en distintos productos cárnicos (0,49-56 µg/kg), pescado (7,1-102,7 µg/kg), verduras y frutas (11,0-95,3 µg/kg) y cereales (1,0 – 3,8 µg/kg) (Yoshida et al., 2001; Munguia-Lopez et al., 2005; Shao et al., 2007; Niu et al., 2012).

3.2.4.2. Liberación al medioambiente

- **Atmósfera**

Como resultado de la actividad industrial, el BPA es liberado a la atmósfera en grandes cantidades estimándose alrededor de 100 toneladas

por año. Por este motivo, se han realizado diversos estudios para determinar estas concentraciones, los cuales han obtenido resultados muy variables dependiendo de la zona en la que se han realizado dichos estudios. Como ejemplo, son los estudios de Berkner et al. (2004) y Matsumoto et al. (2005), en el primero estudiaron las concentraciones en Bavaria (Alemania) obteniendo unos niveles bajos de entre 5 y 15 pg/m³. Sin embargo, Matsumoto determinó los niveles en Osaka (Japón) obteniendo resultados bastante más altos y variables: de 10 a 1920 pg/m³. Observándose, por tanto, niveles mucho más elevados en la zona de Japón en comparación con Alemania.

Fu y Kawamura (2010) analizaron muestras de los 5 continentes y observaron que las concentraciones más bajas se encontraban en las zonas de costa mientras que las concentraciones más altas fueron obtenidas en las regiones urbanas de la India con 4,5 ng/m³. Este dato se debe probablemente a la intensa combustión de productos plásticos con fines domésticos en esta zona.

▪ Agua y efluentes

Normalmente, el BPA se encuentra en concentraciones bajas en la superficie del agua. Se han realizado diversas mediciones en distintos

estudios obteniendo resultados muy diferentes. Por ejemplo, en Portugal se encontraron concentraciones entre 28,7-98,4 ng/dm³ (Rocha et al., 2013), mientras que en Alemania los resultados fueron más elevados entre 4-92 µg/dm³ en la superficie y entre 10-380 µg/kg en el sedimento (Stachel et al., 2003). En otros estudios realizados en el agua de los ríos y los efluentes de los mismos, se indicó que los efluentes que contenían el agua de fábricas relacionadas con BPA eran las fuentes predominantes de BPA de sus respectivos ríos (Lee et al., 2013).

En el caso del agua subterránea, se encontraron concentraciones elevadas de BPA en aquellas situadas cerca de vertederos contaminados con esta sustancia o en vertederos de residuos plásticos, obteniéndose concentraciones de 740 µg/dm³ en Osaka (Japón) (Michalowicz, 2014).

3.2.5. Bioacumulación y biomagnificación

Se han realizado estudios sobre la posible bioacumulación y biomagnificación de BPA y otros disruptores endocrinos (ECDs) en organismos que se encuentran en un nivel elevado de la cadena trófica. Esto se debe a que ciertos ECDs son activados gracias a pequeños ligandos lipofílicos los cuales podrían bioacumularse en organismos acuáticos que son ingeridos por el consumidor (Evenset et al., 2016).

Diversos estudios laboratoriales han obtenido como resultado que el BPA tiene una capacidad muy baja de acumulación en los tejidos de los organismos estudiados. Los factores de bioconcentración obtenidos se encuentran en un rango entre 1,7 y 182, valores que están muy por debajo de los límites utilizados para identificar una sustancia como bioacumulativa (Corrales et al., 2015). Esto puede deberse a que muchos de estos estudios se han llevado a cabo en peces, los cuales tienen una gran capacidad de degradar el BPA a metabolitos fácilmente excretables (Lindholm et al., 2001). Por tanto, estos datos sugieren que para caracterizar mejor la acumulación potencial del BPA en especies acuáticas y en la cadena alimentaria, se necesitan más datos experimentales.

3.2.6. Metabolismo

De todas las rutas posibles de exposición al BPA, la más estudiada y de la que más información se tiene es de la vía oral. Se han realizado diversos estudios en animales de laboratorio (fundamentalmente ratas y primates) obteniéndose diferencias en el metabolismo de esta sustancia (Inoue et al., 2016; VandeVoort et al., 2016).

Cuando se administra vía oral el BPA se absorbe rápidamente desde el tracto gastrointestinal, obteniéndose concentraciones en el plasma muy elevadas que demuestran una absorción del 86 % en ratas y primates. Una vez absorbido, el

BPA se metaboliza por la udp-glucuronico transferasa en la pared del intestino y el hígado conjugándose con el ácido glucurónico (forma inactiva) antes de ser excretado. En roedores, el BPA administrado por vía oral también es glucuronizado rápidamente, pero un porcentaje alto se une a las proteínas plasmáticas, se excreta por la bilis, se escinde de nuevo como BPA libre y se reabsorbe desde el intestino hasta el torrente sanguíneo. Esta recirculación enterohepática puede ocurrir varias veces antes de que se excrete, mayoritariamente por heces, algunos días más tarde. Esto se traduce en una eliminación lenta en comparación con los primates, por lo que la exposición a BPA libre tras su administración va a ser más prolongada (INFOSAN, 2009).

En humanos, se han realizado estudios sobre el metabolismo tras la administración oral de BPA mediante cápsulas de gelatina (Vokel et al., 2005), se demostró que esta sustancia es absorbida rápida y completamente por esta vía (Fig. 8). Además, la ruta metabólica primaria del BPA en el hígado es por la fase II de conjugación en la que se produce una gran cantidad de BPA-glucurónico y en pequeñas cantidades BPA sulfato (Kurebayashi et al., 2010). Debido al alto efecto de primer paso, los niveles en suero de BPA sin conjugar que se registran tras la ingestión son muy bajos, llegan incluso a no detectarse en el estudio original (Volkel et al., 2002), siendo la ruta predominante de excreción de BPA conjugado la orina (Volkel et al., 2005). En diversos estudios se ha encontrado la presencia de BPA en diferentes fluidos corporales como la orina, leche, y fluidos amnióticos y

placentarios, además de en niños y neonatos (Ikezuki et al., 2002; Braun et al., 2011; Altamirano et al., 2015; Ferguson et al., 2015).

Debido a los efectos que el BPA puede tener sobre el desarrollo fetal se han realizado estudios sobre mujeres embarazadas. En el 90% de la orina de población estadounidense analizada se encontró BPA en concentraciones de 0,2-1,6 ng/mL (Calafat et al., 2005), además de detectarse en la mayoría de muestras de sangre, leche materna y líquido amniótico (Vanderberg et al., 2007), ya que el BPA tiene la capacidad de ser transportado a través de la placenta en su forma activa (no conjugada) (Balakrishnan et al., 2010).

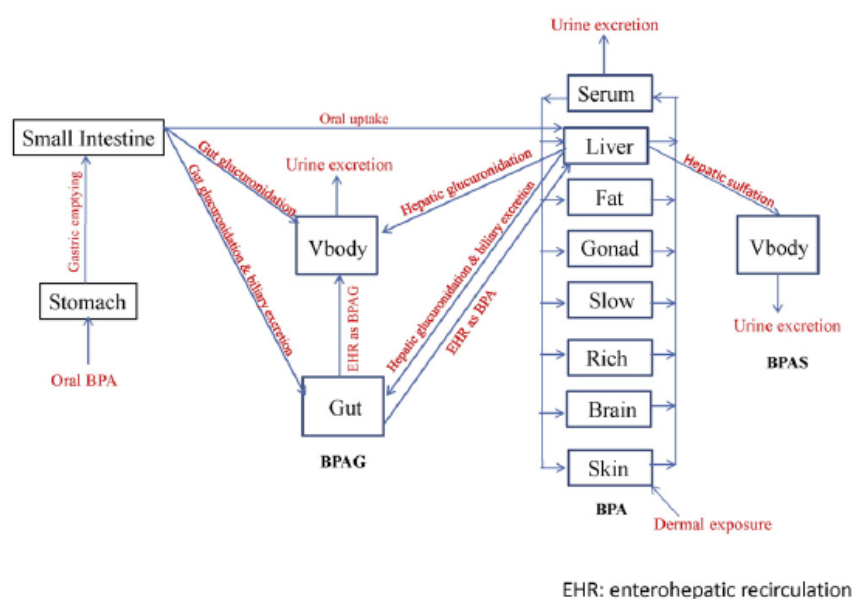


Figura 8. Esquema del metabolismo del BPA (Yang et al., 2015).

3.2.7. Efectos sobre la salud humana

Debido al amplio uso industrial de BPA y a la posibilidad demostrada de entrada en nuestro organismo por distintas vías, se han descrito efectos a distintos niveles orgánicos en seres humanos (Konieczna et al., 2015). Entre los efectos descritos destacamos, (1) efectos sobre la reproducción, (2) efectos sobre el páncreas endocrino, (3) efectos sobre el sistema inmune, (4) acción sobre la hormona tiroidea y (5) efectos sobre el tejido adiposo, entre otros.

3.2.7.1. Efectos sobre la reproducción

Debido a su estructura fenólica, se ha demostrado que el BPA interacciona con los receptores estrogénicos para actuar como agonista o antagonista en las vías de señalización endocrina dependientes de receptores. Por tanto, se ha demostrado que el BPA juega un papel importante en la patogénesis de diversos desórdenes endocrinos relacionados con la reproducción como son la infertilidad femenina y masculina, la pubertad precoz, la aparición de tumores hormonalmente dependientes como el cáncer de mama y de próstata y con distintos desórdenes metabólicos incluyendo el síndrome de ovario poliquístico (Konieczna et al., 2015)

El BPA ha sido implicado junto con otros disruptores endocrinos por numerosos estudios en una disminución de la fertilidad en las hembras, y actualmente se estudia en profundidad el papel de los estrógenos sobre el desarrollo de los oocitos, por ser un tema de considerable interés para los investigadores.

Las células de la teca en su última fase folicular expresan ambos receptores tanto el ER α como el ER β , mientras que las células de la granulosa expresan predominantemente el ER β . En consecuencia, el BPA tiene potencial para afectar tanto a las células de la teca como a las células de la granulosa, sin embargo, el grado de impacto y la afinidad sobre estas células ováricas es desconocido (Routledge et al., 2000; Matthews et al., 2001).

El impacto del BPA, a dosis tan bajas como 0,1 nM sobre las células granulomatosas en el ovario de ratón fue investigado por Xu et al. (2002) quienes encontraron a estas dosis tan bajas, una disminución de la viabilidad de las células de la granulosa por apoptosis, sugiriendo que éstas células son altamente sensibles al BPA. En un estudio in vivo se encontró que la exposición crónica a bajas dosis de BPA causó aneuploidía meiótica en oocitos de ratones, lo que implica al BPA en la disrupción de la meiosis en las hembras (Hunt et al., 2003).

La exposición en mujeres embarazadas es una preocupación debido a la posibilidad de bioacumulación en los fetos y en períodos sensibles específicos durante el desarrollo embrionario (Lee et al., 2003; Sun et al., 2004; Wetherill et al., 2007, Gerona et al., 2016). Diversos estudios han demostrado que las mujeres embarazadas están expuestas posiblemente a niveles más altos de BPA que la población en general (Lee et al., 2003; Kruger et al., 2008). También se conoce que el BPA atraviesa la placenta, según lo evidenciado por su presencia en el tejido placentario y líquido amniótico (Wetherill et al., 2007). Además, un estudio reciente en células placentarias expuso los múltiples efectos deletéreos demostrados por el BPA en varios resultados adversos de embarazo tales como preeclampsia, niños prematuros y pérdida del embarazo lo que podría ayudar a explicar abortos involuntarios de etiología desconocida (Benachour y Aris, 2009).

En cuanto a animales de laboratorio, en ratones hembra se produjo un incremento en la mortalidad de los embriones tras exponer a las madres a dosis de 25 µg/kg/día (Al Hiyasat et al., 2004). La exposición fetal con BPA a través de la madre resultó en un comienzo temprano del desarrollo en la maduración de ratones hembras a 2,4-20 µg/kg/día (Howdeshell et al., 1999; Honma et al., 2002).

La exposición a BPA durante la gestación y la lactación causa la aparición de unos niveles reducidos de testosterona y de hormona folículo estimulante (FSH) y una elevación de los estrógenos en la descendencia adulta, así como disrupción del ciclo estral en las ratas y los ratones adultos por lesiones ováricas a dosis de entre 50 y 2500 µg/kg/día (Talsness et al., 2000; Nikaido et al., 2004; Ma et al., 2017). Además, altera los niveles de la hormona luteinizante (LH) a dosis de 2 µg/kg/día (Akingbemi et al., 2004).

Ejemplos de efectos causados sobre las células y los tejidos reproductivos masculinos por exposición a bajas dosis de BPA en ratas y ratones, son una significativa disminución en la producción diaria de esperma y en la fertilidad en machos a dosis de entre 0,2 y 20 µg/kg/día (vom Saal et al., 1998; Sakaue et al., 2001; Al Hiyasat et al., 2002; Chitra et al., 2003). Estudios sobre las células de Leydig en adultos, demostraron que bajas dosis de BPA (0,01 nM) disminuyen la síntesis de testosterona en un 25% como resultado de una disminución en la expresión de la enzima esteroideogénica 17α-monooxigenasa (Kawai et al., 2003; Akingbemi et al., 2004). Estos hallazgos demuestran que el periodo perinatal es una ventana de sensibilidad para la exposición al BPA en este sistema animal (Wetherill et al., 2007).

3.2.7.2. Efectos sobre el páncreas endocrino

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó en el informe del año 2014 que más de 422 millones de personas en el mundo padecen diabetes mellitus, con una prevalencia mundial de 8,5% en población adulta, habiéndose duplicado estos datos desde el año 1980. La diabetes tipo 2 comprende el 90% de la gente afectada, y se estima que la diabetes es responsable de 1,5 millones de muertes al año. Las causas parecen misteriosas, aunque la predisposición genética, la obesidad, la dieta, la falta de ejercicio y una población envejecida están entre las principales causas consideradas (www.diabetes.org). La diabetes tipo 2 ocurre tras un periodo prolongado de resistencia a la insulina, caracterizada por una disminución de la acción de la insulina en tejidos periféricos. También es la principal causa del síndrome metabólico caracterizado por obesidad visceral, dislipidemia, hiperglicemia e hipertensión (Biddinger y Kahn, 2006).

El BPA afecta drásticamente las funciones de los islotes de Langherans, la unidad fisiológica del páncreas endocrino. Cada islote contiene entre 1.000 y 3.000 células de cinco tipos, las más abundantes son las células β , que sintetizan y liberan la insulina y las células α que sintetizan y secretan el glucagón (Brissova et al., 2005; Cabrera et al., 2006).

En estudios sobre ratones se demostró que el BPA y el estradiol tienen la misma potencia y eficacia, además ambos inhiben la liberación de adiponectina de los adipocitos humanos a 1 nM, más allá de una implicación adicional del BPA en la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico en humanos a niveles actuales de exposición (Hugo et al., 2008; vom Saal y Myers, 2008). Las concentraciones a las cuales el BPA afecta a las células α y β están dentro del rango de BPA detectado en el suero humano (0,9-8,8 nM) (Takeuchi y Tsutsumi, 2002). Weldingh et al. (2017) demostraron que exposiciones de entre 5 y 500 nM de BPA en exposiciones de 72 horas provocaban una disminución significativa de las células β , así como, un incremento de la secreción de insulina tras 2 horas de exposición. El tratamiento en ratones machos adultos durante 4 días con dosis diarias de 100 $\mu\text{g/kg/día}$ alteró el contenido y la secreción de la insulina pancreática, provocando hiperinsulinemia postprandial y resistencia a la insulina en ratones machos (Alonso-Magdalena et al., 2006).

Un exceso en la acción $\text{ER}\alpha$ mediada por un estrógeno como el BPA provocaría un aumento en el contenido y secreción de las células β pancreáticas in vivo e in vitro, sobreestimulando a las células β (Fig. 9). Una excesiva señal de insulina en el hígado o el endotelio produce dislipidemia, y en el tejido graso produce obesidad, intolerancia a la glucosa y dislipidemia (Biddinger y Kahn, 2006). Además, una excesiva señal de insulina puede

provocar resistencia a la insulina en el hígado y el músculo (Ueno et al., 2005), así como, un agotamiento de las células β y de esa forma contribuir al desarrollo de diabetes tipo 2 (Nadal et al., 2009). Es por tanto que los efectos del BPA sobre el páncreas endocrino, tanto a nivel de las células β -pancreáticas como sobre los niveles de insulina, presentan una repercusión importante, no sólo sobre el páncreas endocrino, sino a distintos niveles orgánicos (Fig. 9).

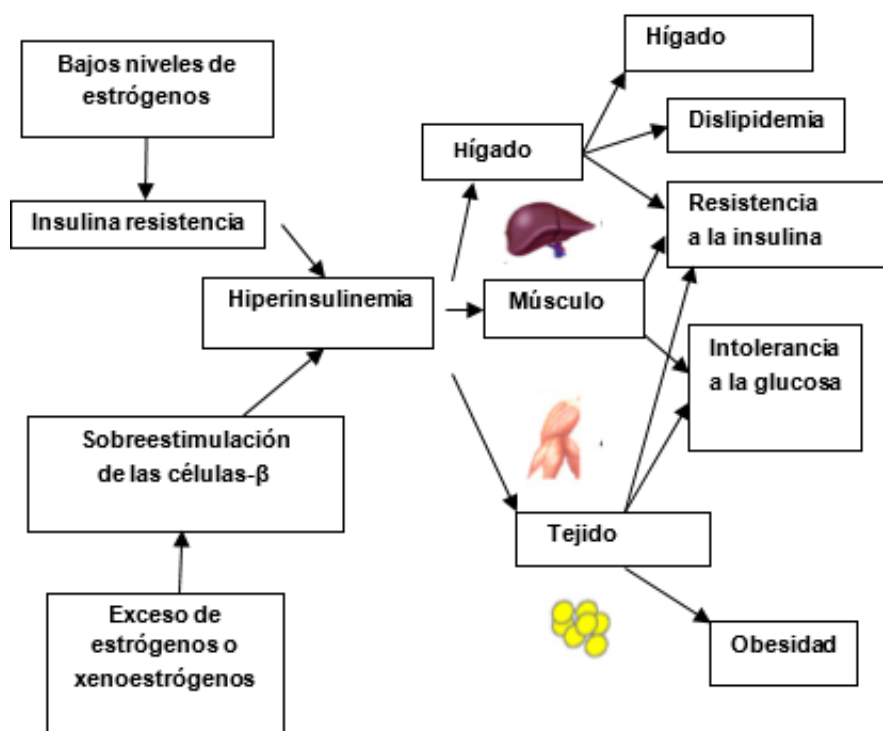


Figura 9. Excesiva señal de insulina en diferentes tejidos.

Estimulación del ER α por exposición al BPA en presencia de glucosa, sobreestimando las células β , induciendo hiperinsulinemia postprandial, intolerancia a la glucosa e insulina resistencia. La hiperinsulinemia generada por el exceso o la ausencia de señal ER α puede producir dislipidemia y obesidad cuando afecta a las células grasas y hepáticas (Nadal et al., 2009).

Se ha demostrado que la diabetes tipo 2 solamente se desarrolla en sujetos insulina resistentes con inicio de disfunción de las células β . En seres humanos adultos, sin embargo, existe evidencia epidemiológica de que el BPA actúa como un importante factor de riesgo dentro del desarrollo de la diabetes

tipo 2 (Lang et al., 2008). Además, hay nexos causales entre la exposición al BPA y la resistencia a la insulina (Alonso-Magdalena et al., 2006), alteración de la biosíntesis de la insulina y secreción de las células β en ratones macho adultos (Alonso-Magdalena et al., 2008) y disminución de la adiponectina de los adipocitos humanos (Hugo et al., 2008).

Aunque dos de las causas principales de fallo en las células β en la diabetes tipo 2 son la sobrenutrición y la carencia de ejercicio, los estrógenos ambientales, en particular el BPA, son fuertes candidatos a exacerbar y acelerar el desarrollo de la diabetes tipo 2 (Nadal et al., 2009).

3.2.7.3. Acción sobre la hormona tiroidea

La hormona tiroidea (TH) es esencial para el desarrollo normal del cerebro tanto en seres humanos como en animales (Dussault y Ruel, 1987). Existe una cierta evidencia de que el BPA se une a los receptores de la hormona del tiroides (TR), actuando como antagonista de la activación de la triyodotironina (T3) (Moriyama et al., 2002). Además, se encontró que la exposición al BPA en ratas produce un perfil endocrino similar al que se observa en el síndrome de resistencia a la hormona tiroidea (Cheng, 2005).

Estudios in vivo que examinaban los efectos del BPA sobre la hormona del tiroides han sido llevados a cabo en ratas expuestas a 1, 10, o 50 mg/kg de peso vivo, en ratas perinatales (Zoeller et al., 2005), observando en el día 15 posterior al nacimiento una sobre regulación de los niveles del gen responsable de la hormona tiroidea en el cerebro. Meerts et al. (2001) demostraron que los compuestos polibrominados del BPA tienen actividad estrogénica, demostrando que los derivados brominados actúan como TR agonistas en las células GH3 de la pituitaria, Lee et al. (2017) determinó efectos de baja regulación en células GH3 de pituitaria de rata causados por el BPA y análogos del mismo como el bisfenol S (BPS).

3.2.7.4. Efectos sobre el sistema inmune

Se conoce bien que los estrógenos juegan un papel fundamental en el sistema inmune, distintos hallazgos demuestran que el BPA es capaz de influenciar las funciones del sistema inmune (Holdstock et al., 1982, Rogers et al., 2013, Gostner et al., 2014). Por otro lado, las enfermedades alérgicas tales como el asma bronquial y la dermatitis atópica han crecido marcadamente durante las últimas décadas en los países desarrollados (Burr et al., 1989; Bjorksten, 1999; von Mutius, 2000). Revisando todos los datos disponibles se ha sugerido que los factores ambientales contribuyen a este aumento observado

en las enfermedades alérgicas (Fujimaki et al., 1994; Takano et al., 1997; Nel et al., 1998). También se ha observado que enfermedades autoinmunes tales como la púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), el lupus eritematoso sistémico (SLE), la dermatomiositis y la escleroderma han aumentado de forma alarmante durante varias décadas (Yurino et al., 2004). Al mismo tiempo, ha existido un aumento de la atención científica y social en productos químicos que podemos encontrar en el medioambiente y que pueden ser incorporados a nuestro organismo por ingestión o absorción, mimetizando las acciones de los estrógenos, siendo uno de estos productos químicos el BPA.

También se han examinado los efectos del BPA sobre la producción de interleukina-4 (IL-4), una citoquina proinflamatoria muy asociada a la respuesta alérgica inmune, llegando a la conclusión de que el BPA aumenta la producción de varias citoquinas, incluyendo la IL-4 (Lee et al., 2003; Tian et al., 2003).

3.2.7.5. Efectos sobre el tejido adiposo

La incidencia de la obesidad ha crecido notablemente en las últimas décadas, aunque se ha considerado como principales causas una alta dieta calórica y un estilo de vida sedentaria, el rol de los factores medioambientales está ganando crédito (Hugo et al., 2008).

La adiponectina es una hormona específica de los adipocitos que incrementa la oxidación de ácidos grasos y el metabolismo de la glucosa en el músculo, reduce la salida de glucosa y aumenta la sensibilidad a la insulina en el hígado, también tiene funciones protectoras contra el síndrome metabólico (Kadowaki et al., 2006) el cual incluye obesidad abdominal, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia e hipertensión y es asociado con un aumento en el riesgo de diabetes y enfermedades cardiovasculares (Ritchie y Connel, 2007). La disponibilidad de la adiponectina es controlada a 3 niveles: biosíntesis, ensamblaje y liberación (Trujillo y Scherer, 2005). La síntesis es estimulada por el agonista PPAR γ , la insulina y el IGF-1 e inhibido por el TNF α y las catecolaminas (Lihn et al., 2005). El BPA podría suprimir la adiponectina por un antagonismo del PPAR γ (Wright et al., 2000; Knouff y Auwerx, 2004).

La formación correcta de enlaces disulfuro es crítica para el ensamblaje y retención de adiponectina (Trujillo y Scherer, 2005). La formación del enlace disulfuro dentro del retículo endoplásmico es catalizado por oxirreductasas, de las cuales la proteína disulfuroisomerasa (PDI) juega un papel crítico (Tsao et al., 2003; Wang et al., 2007). Puesto que se publicó que el BPA se unía a la PDI inhibiendo su actividad enzimática, éste podría representar otro mecanismo por el cual el BPA inhibe a la adiponectina (Ben-Jonathan et al., 2009).

3.2.7.6. Otros efectos

El BPA provoca otros efectos a diferentes niveles, como cambios en los receptores de somatostatina del cerebro a dosis muy bajas de 400 µg/kg/día (Facciolo et al., 2002), efectos comportamentales que incluyen hiperactividad a 30 µg/kg/día (Ishido et al., 2004), un incremento en la agresividad a 2-40 µg/kg/día (Farabollini et al., 2002; Kawai et al., 2003) una alterada reacción al dolor a 40 µg/kg/día (Aloisi et al., 2002), una alteración del aprendizaje a 100 µg/kg/día (Negishi et al., 2004). De manera importante, Lang et al. (2008) en su estudio, relacionaron altas concentraciones de BPA en la orina de humanos con un incremento en la prevalencia de enfermedades coronarias.

Seiwa et al. (2004) demostraron que el BPA bloquea el desarrollo de la T3 inducida por las células precursoras oligodendrocíticas (OPCs). Además, puede haber una asociación entre el síndrome de resistencia a la hormona tiroidea y el síndrome de atención dispersa e hiperactividad (ADHD) en los seres humanos (Vermiglio et al., 2004; Siesser et al., 2005) y en las ratas (Siesser et al., 2005), por lo tanto, es potencialmente importante que las ratas expuestas al BPA mostraran síntomas parecidos a los del ADHD (Ishido et al., 2004).

La exposición al BPA también altera la histogénesis neocortical en el ratón, siendo posible que el BPA altere el desarrollo temprano de la corteza interfiriendo con la señalización de la hormona tiroidea (Nakamura et al., 2006).

3.2.8. Biomonitorización

La forma convencional de evaluación de la exposición al BPA es a través de la medición de BPA total y aglicona habitualmente en orina. La orina es utilizada ya que es la principal vía de excreción de BPA glucuronoconjugado y la recogida de muestras es mínimamente invasiva (Andra et al., 2016). Sin embargo, debido a la corta vida media del BPA en humanos (alrededor de 6h), los niveles observados sólo reflejan una exposición reciente a BPA, limitando su uso como biomarcador (Calafat et al., 2015). Los métodos analíticos actuales determinan la concentración total de BPA tras su hidrólisis enzimática a 37 °C durante varias horas y en algunos casos durante la noche. Habitualmente se han usado solo enzimas β -glucuronidasas para el paso de desconjugación debido a la presencia predominante de BPA conjugado con ácido glucurónico (BPAG), mientras que en menos ocasiones se ha usado enzima sulfatasa para la liberación de BPA de los conjugados con sulfato (BPAS), lo cual ocurre en menos ocasiones. Sin embargo, las mediciones se consideran imprecisas y subestimadas, debido a varias razones: baja concentración de enzimas, elección errónea de enzimas, desconjugación

incompleta, condiciones no favorables y ante todo, un protocolo de desconjugación subóptimo (Andra et al., 2016).

Sin embargo, la cuantificación de BPA total en orina es solo válida si se mantiene controlada la posible contaminación externa. Esto se debe a que la introducción de BPA procedente de fuentes externas eleva la aglicona y también los niveles totales de BPA, por tanto, medir uno de ellos no es necesariamente un biomarcador fiable (Andra et al., 2016). Esto ha hecho que se considere cada vez más la cuantificación de BPAG y BPAS ya que los niveles no se ven afectados ni por la manipulación de las muestras ni por los procedimientos analíticos. La especificidad de BPA es similar al BPA aglicona en los estudios de evaluación de exposición; sin embargo, la frecuencia de detección de BPAG en orina es casi siempre mayor que las agliconas. En las poblaciones que han sido estudiadas, el BPAG se detectó casi en todas las matrices humanas (orina, plasma, suero y sangre de cordón umbilical).

Por otro lado, el BPAG se encontró con más frecuencia que el BPAS o BPADS. Las tasas de detección han sido variables en distintos estudios, con entre un 61% y 100% en orina (Nachman et al., 2013; Hauck et al., 2016) y entre el 0% y 100% en sangre (Volkel et al., 2005; Vandenberg et al., 2014). Las concentraciones de BPAG fueron comparativamente superiores a las de BPA aglicona en dichas matrices. Por ejemplo, el BPAG se encontraba en un rango de 0,05 a 65,2 ng/mL en orina y 0,05-

11,9 ng/mL en suero mientras que el BPA aglicona se encontraba en unos rangos de 0,01-0,187 ng/mL y 0,01-0,59 ng/mL respectivamente en las muestras analizadas de la población de estudio (Liao et al., 2012). El BPA por su parte, se encontraba por encima de los niveles de estudio en suero de adultos (Liao et al., 2012), suero del cordón umbilical (Gerona et al., 2013) y orina (Provencher et al., 2014). El BPADS ha sido incluido en menos ocasiones entre los conjugados de BPA analizados, y raramente se encuentra por encima de los niveles de detección de los estudios en los que se ha incluido (Andra et al., 2016) (Fig. 10).

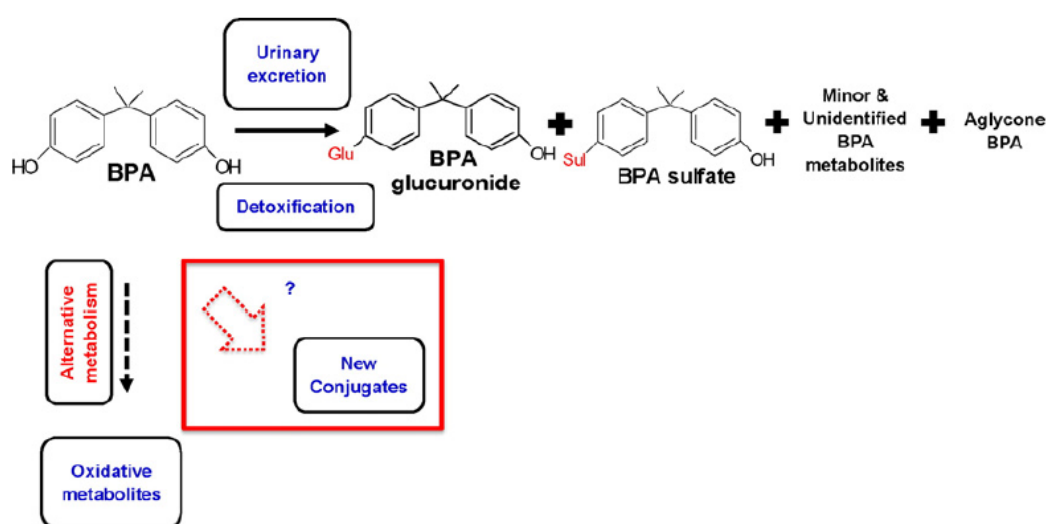


Figura 10. Metabolismo del BPA (Andra et al., 2016)

3.2.9. Legislación

Se autoriza el uso del BPA en Europa mediante la Directiva 2002/72 CE de la Comisión en Agosto de 2002 como monómero y aditivo para la fabricación de materiales plásticos que pueden estar en contacto con alimentos siempre que el BPA tuviera una migración de 0,6 mg/kg. Se enmienda esta directiva posteriormente el 28 de Enero de 2011 con la Directiva 2011/8/EU en la cual se establece una prohibición de su uso en biberones. Los análisis de los estudios presentados a la EFSA para la evaluación del riesgo, ha dado como resultado la modificación de la ingesta diaria tolerable de BPA en los alimentos, pasando de 50,4 µg/kg de peso/día a 4 µg/kg de peso/día. Esto se debió a las incertidumbres que rodean a los efectos potenciales para la salud de esta sustancia.

Francia fue pionera en prohibir la producción, comercio y marketing de recipientes de comida que contuvieran BPA. Esta decisión se llevó a cabo tras las recomendaciones de la Agencia de Seguridad Alimentaria y Ambiental francesa (ANSES) en septiembre del 2011 de disminuir la exposición de la población. Un año más tarde, en septiembre de 2012 la agencia propuso una clasificación más estricta para el BPA como “tóxico para la reproducción” (ANSES, 2016). Por ello, aunque ya estaba prohibido el uso de BPA en biberones a nivel europeo, Francia prohibió en 2013 el uso de esta sustancia en todos recipientes alimentarios para bebés y niños de corta edad y para el resto de productos en enero de 2015. Pero esta prohibición supone un reto, ya que encontrar sustitutos para el BPA en los recipientes puede

ser difícil en el caso de alimentos ricos en grasas o ácidas como las bebidas gaseosas, tomate, mostazas, entre otros.

En cuanto a la legislación española, existe la restricción del uso de BPA en biberones mediante la Orden PRE/628/2011 (2011) que modifica el Anexo II del Real Decreto 866/2008 en el que se aprueban la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos de plástico destinados a entrar en contacto con los alimentos.

En el último informe de la EFSA en 2015 se concluye que la exposición por dieta a BPA para los grupos de mayor exposición (incluyendo niños y adolescentes) es inferior a la IDA de 4 µg/kg de peso/día. El problema radica en que la exposición al BPA (independientemente de la vía de exposición), conjuntamente a otros compuestos de actividad endocrina podrían potenciar los efectos sobre el organismo expuesto, aunque esto aún está en evaluación.

Recientemente, la Agencia Europea de Sustancias y Mezclas Químicas (ECHA), apoyando la decisión tomada por Francia, ha incluido el BPA en la lista de químicos “altamente preocupantes debido a sus propiedades de alteración del sistema endocrino, que causan graves efectos en la salud humana” (ECHA, 2017).

3.3. Tejido muscular Esquelético

El tejido muscular esquelético está formado por células o fibras musculares de morfología cilíndrica, cuyo tamaño es muy variable, entre 10-120 μm de diámetro, y con gran longitud, algunas tan largas como los músculos de los que forman parte. El tamaño de las fibras musculares varía con la edad, el ejercicio, el estado nutricional, el sexo y la posición de la fibra dentro del músculo.

La membrana plasmática de las fibras musculares se denomina sarcolema, que en el tejido muscular esquelético presenta unas invaginaciones denominadas túbulos T. Cada túbulo T está asociado a dos cisternas terminales del retículo endoplásmico liso, que está muy desarrollado y se denomina retículo sarcoplásmico, formando una estructura denominada triada. Las triadas son de gran importancia para la regulación de la contracción muscular y abrazan a los haces de miofibrillas a intervalos regulares, en los mamíferos coinciden con las transiciones entre la banda A e I. Los túbulos T permiten que la despolarización del sarcolema llegue a regiones profundas del citoplasma, induciendo la salida de Ca^{++} de las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico, lo que inicia el mecanismo de la contracción muscular.

El sarcoplasma es intensamente eosinófilo y entre las organelas más significativas está el ya mencionado retículo sarcoplásmico, numerosas mitocondrias o sarcosomas, que se disponen a lo largo de los haces de miofibrillas, así como

gránulos β de glucógeno, que constituyen la principal fuente de energía para la contracción muscular. Frecuentemente también se observan pequeñas vacuolas lipídicas que almacenan triglicéridos como fuente de energía. En los polos de cada núcleo se disponen pequeños Complejos de Golgi.

En el sarcoplasma también existen numerosas proteínas, entre las que destaca la mioglobina, cuya función es almacenar oxígeno para ser utilizado en la glucólisis aeróbica, mediante la que se obtiene energía durante la contracción muscular. La mioglobina le da el característico color rojo macroscópico a los músculos. Si su contenido es elevado a las fibras musculares se les denomina fibras rojas, también llamadas de tipo I, contienen abundantes mitocondrias y poco glucógeno, tienen metabolismo aeróbico, por lo que son poco fatigables y de contracción lenta. Estas fibras predominan en los músculos encargados de mantener la postura y están muy irrigadas. Si el contenido en mioglobina es bajo se denominan fibras blancas, (tipo II) tienen menor cantidad de mitocondrias que las tipo I y más glucógeno, su metabolismo es principalmente anaeróbico, por lo que son de contracción rápida pero se fatigan fácilmente. Estas fibras predominan en los músculos que producen movimientos rápidos y precisos, ej. músculos oculares. En general los músculos tienen una proporción variable de cada tipo de fibras, en algunos de ellos el predominio de un tipo es muy elevado, así en las aves los músculos de las patas son rojos y los pectorales son blancos. Cada neurona motora da terminaciones en fibras de un solo tipo, que es determinado por la frecuencia de los impulsos nerviosos que recibe.

Con la tinción de hematoxilina eosina los distintos tipos de fibras musculares sólo se diferencian porque las tipo I son ligeramente más pequeñas. Algunas técnicas histoenzimáticas son muy útiles para identificar los tipos de fibras musculares; así la actividad ATPasa de la miosina es mayor en las fibras tipo I, al igual que ocurre con la técnica de la succinato deshidrogenasa, enzima mitocondrial que participa en el ciclo de Krebs y, por tanto, tiene mayor actividad en las fibras tipo I. Según la actividad ATPasa, las fibras tipo II se subdividen en dos subtipos, IIa (con capacidad oxidativa) y IIb (con capacidad oxidativa y glucolítica).

La estructura más importante y más abundante del sarcoplasma son las miofibrillas, que en el músculo esquelético ocupan entre el 60 y el 70% del volumen citoplasmático, y miden entre 1-2 μm de diámetro. En cortes transversales aparecen agrupadas en áreas poligonales (campos de Conheim) aunque actualmente se consideran un artefacto de retracción más que una estructura funcional. En cortes longitudinales las miofibrillas presentan estriaciones transversales fuertemente refringentes, que se tiñen intensamente con la hematoxilina férrica.

Las miofibrillas están constituidas principalmente por proteínas contráctiles: la actina, que forma parte de los miofilamentos delgados (60 Å de grosor aproximadamente) y la miosina, que forma parte de los miofilamentos gruesos (de unos 160 Å de grosor aproximadamente). En el músculo esquelético y cardíaco los

miofilamentos presentan una ordenación muy característica que da lugar a las estriaciones transversales observadas con el microscopio óptico.

Estructura y ultraestructura de las miofibrillas

Con el microscopio óptico de luz polarizada se observan bandas anisótropas (banda A) alternando con bandas isótropas (banda I). Con el microscopio electrónico se observó que la banda A era electrodensa y está compuesta por miofilamentos gruesos y delgados, mientras que la banda I muestra baja electrodensidad, y está formada solo por miofilamentos delgados. En el centro de la banda I existe una línea electrodensa (línea Z), donde se fijan los miofilamentos delgados mediante una proteína denominada α -actinina. Al espacio que queda entre dos líneas Z se le denomina sarcómero, y es la unidad de contracción muscular. En el centro de la banda A existe otra banda más pequeña y de menor electrodensidad, compuesta exclusivamente por miofilamentos gruesos y denominada banda H. En el centro de la banda H existe otra línea electrodensa (aunque menos que la línea Z) que se denomina línea M, a la que se anclan los miofilamentos gruesos mediante varias proteínas. En los cortes transversales a nivel de la banda A se observa que cada miofilamento grueso está rodeado por 6 miofilamentos delgados. Esta ordenación de los miofilamentos gruesos y delgados se mantiene gracias a filamentos intermedios de vimentina y desmina que se fijan a los discos Z y al sarcolema, mientras que la distrofina une la actina al sarcolema, que a su vez están unidas a glucoproteínas de la lámina externa a la que transmiten el movimiento durante la contracción muscular.

Los miofilamentos gruesos están compuestos principalmente por miosina, que es una proteína contráctil con forma de “palo de golf”, a la cola se le denomina meromiosina ligera, y a la cabeza meromiosina pesada y tiene actividad ATPasa. Las moléculas de miosina se polimerizan para formar los miofilamentos gruesos de forma que las colas quedan en el interior del filamento, mientras que las cabezas sobresalen de él, presentando un ángulo de 60° entre una cabeza y la siguiente, existiendo por tanto 6 cabezas de miosina para formar un giro completo (360°) al miofilamento.

Los miofilamentos delgados están compuestos por moléculas globulares de actina (actina G), que polimerizan para formar una doble hélice. Cada molécula de actina G presenta un sitio activo de unión con la miosina. A lo largo de esta doble hélice se dispone una proteína fibrilar, la tropomiosina, que en condiciones de reposo se dispone tapando los sitios activos que la actina presenta para unirse a la miosina. A ciertos intervalos existe otra proteína globular, la troponina, que tiene tres partes, la TNi, unida a la actina, la TNc, que puede unirse a iones de Ca^{++} , y la TNt, que se encuentra unida a la tropomiosina.

3.3.1. Mecanismo de la contracción muscular

La contracción muscular se inicia cuando se libera Ca^{++} del retículo sarcoplásmico, al aumentar su concentración en el citoplasma se une a la TNc, en la que provoca un cambio de conformación arrastrando a la TNi y a la tropomiosina, quedando libre el sitio activo de unión actina-miosina. Inmediatamente se produce

dicha unión, lo que activa a la ATPasa de la cabeza de la miosina, el consumo de una molécula de ATP da lugar a un cambio de conformación de la miosina, que actúa a modo de bisagra arrastrando a la actina y por tanto al miofilamento delgado. A continuación se rompe la unión actina-miosina y la cabeza de miosina está lista para unirse otra vez a la actina. Este ciclo se repite cientos de veces por segundo, de modo que los miofilamentos delgados son arrastrados por las cabezas de miosina introduciéndose entre los miofilamentos gruesos. El resultado es que se acorta el sarcómero, la suma de los acortamientos de todos los sarcómeros de todas las miofibrillas de una célula muscular produce un acortamiento de ésta, y al acortarse un grupo de células musculares provocan el acortamiento del músculo en su conjunto, que transmitirá el movimiento a los huesos o estructuras en las que se inserta. El músculo esquelético se contrae siguiendo la "ley del todo o nada", cada célula puede contraerse o no, y es el número de células musculares que se contraen al mismo tiempo en un músculo lo que determinará la intensidad de contracción de éste.

Cuando el Ca^{++} vuelve al retículo sarcoplásmico, mediante una bomba Ca^{++} - Mg^{++} dependiente con consumo de energía, la troponina vuelve a su lugar inicial, impidiendo la unión actina-miosina, por lo que los filamentos vuelven a su posición inicial. La contracción de los músculos que se produce varias horas después de la muerte (rigor mortis) se debe al agotamiento del ATP, por lo que la bomba Ca^{++} - Mg^{++} deja de funcionar los iones Ca^{++} no pueden entrar en el retículo

sarcoplásmico, por lo que los filamentos de miosina no pueden separarse de los de actina y los músculos quedan contraídos de forma permanente.

3.3.2. Regulación de la contracción muscular

Las fibras musculares esqueléticas están inervadas por motoneuronas localizadas en las astas ventrales de la medula espinal mediante terminaciones (placas neuromusculares). Cada motoneurona inerva un grupo, entre 10 y 1000 fibras musculares, que se contraen al mismo tiempo (unidad motora). Cuando la motoneurona envía un impulso nervioso a la placa neuromuscular se libera acetilcolina, que se une a receptores del sarcolema produciendo una despolarización de esta membrana, la cual se transmite por los túbulos T, provocando una salida masiva de Ca^{++} del retículo sarcoplásmico, lo que desencadena la contracción muscular. Si no se producen mas impulsos nerviosos, una acetilcolinesterasa presente en la lamina basal que rodea al sarcolema degrada la acetilcolina, cesando la despolarización del sarcolema, con lo que la bomba $\text{Ca}^{++}\text{-Mg}^{++}$ introduce el Ca^{++} dentro del retículo sarcoplásmico donde es retenido por una proteína, la calsecuestrina, cesando la contracción muscular.

3.3.3. Fibra muscular

Desde que Stefano Lorenzini en 1678 (citado por Dellmann, 1994) clasificara a los músculos por su color en rojos y blancos se inician una serie de estudios que tratan de buscar una explicación a este hecho basándose en las características estructurales y/o fisiológicas de la propia fibra muscular. Más tarde Ranvier en 1880 (citado por Dellmann, 1994) establece que dependiendo del aporte sanguíneo que recibe el músculo se dividen: fibras de contracción lenta o fibras rojas y las de contracción rápida o fibras blancas.

Las fibras musculares o miocitos constituyen las unidades celulares básicas del tejido muscular estriado esquelético (músculo esquelético). Se trata de células extraordinariamente largas, de 1 a 40 mm de longitud y de diámetro variable, entre 10 y 120 micrómetros, que a menudo recorren toda la longitud del músculo (fibras cilíndricas) desde el origen a la inserción. Sin embargo, existen otras (fibras cónicas) que sólo se unen por un extremo al punto de inserción, mientras que por el otro terminan en el seno del propio músculo adhiriéndose fuertemente a los tabiques conectivos del endomisio. También se describen fibras fusiformes, que no tienen relación alguna con los extremos del músculo, Maillet (1980). Todas ellas presentan la peculiaridad de ser células multinucleadas a modo de un sincitio continuo, Dellmann (1994). En los mamíferos estos núcleos se sitúan normalmente en la periferia, próximos al sarcolema o membrana de la fibra muscular es decir, en posición subsarcolémica. Tienen forma ovalada, una longitud media de entre 8 y 10

micrómetros, y su número puede superar los varios centenares en una fibra muscular. El citoplasma de las fibras que recibe el nombre de sarcoplasma, contiene los elementos contráctiles del músculo denominados miofilamentos, que se agrupan para formar las miofibrillas, además de otras estructuras citoplasmáticas: retículo liso denominado retículo sarcoplásmico, complejo de Golgi, mitocondrias o sarcosomas, vacuolas lipídicas, glucógeno y mioglobina. Esta última representa el pigmento muscular que le da la coloración roja al músculo.

El tejido muscular es un tejido muy especializado, constituido por células musculares que contienen grandes cantidades de proteínas contráctiles (actina y miosina), y además tienen la capacidad de contraerse de forma coordinada en una determinada dirección para producir movimiento. Debido a la morfología alargada de las células musculares se denominan fibras musculares o miofibras, se disponen paralelas unas a otras para formar fascículos de fibras orientadas en el sentido de la contracción.

Según las características morfológicas y funcionales, tanto de las células como de su disposición para formar en tejido, se diferencian 3 tipos de tejido muscular:

Tejido muscular esquelético: forma parte del sistema musculoesquelético y de ciertos órganos como la lengua y el globo ocular. Las fibras musculares presentan estriaciones transversales en el citoplasma y son de contracción voluntaria.

Tejido muscular cardíaco: forma la musculatura del corazón (miocardio), sus células musculares también presentan estriaciones transversales en el citoplasma, aunque el término "músculo estriado" suele utilizarse para designar al músculo esquelético. La contracción de las miofibras cardíacas es involuntaria y rítmica.

Tejido muscular liso: forma parte de las vísceras y pared de los vasos sanguíneos entre otras localizaciones. Las células musculares lisas no presentan estriaciones transversales en el citoplasma y son de contracción involuntaria.

3.3.4. Procesos patológicos

Las fibras musculares son células que reaccionan frente a distintos estímulos produciendo un aumento de su tamaño o hipertrofia. Uno de los agentes que favorece el aumento de su tamaño es el β -agonista, pero en diferentes tratamientos con clenbuterol se hipertrofian (Apseloff, et al., 1993 y Lavoie, et al., 2002), siendo esta reacción reversible, ya que una vez que se suspenden los tratamientos se pierde el aumento del tamaño (Bakker, et al., 1998), e incluso la retirada del clenbuterol puede llegar a producir el efecto contrario, es decir una atrofia de las fibras musculares (Chen, et al., 2000 y Gil, et al., 2001).

La "apoptosis" es la muerte celular programada debido a una liberación de las endonucleasas. Las fibras musculares son células que sufren ese tipo de muerte

celular en diversos procesos patológicos, entre los que se destacan las atrofas marcadas tras procesos de activación de dichos elementos celulares, como en el caso de tratamientos alternativos con $\beta 2$ -agonistas (Apseloff, et al., 1993).

El aumento del tamaño de las fibras musculares se relaciona con variaciones de la actividad enzimática, destacándose que dicho aumento de volumen dispersa entre otros componentes a sus mitocondrias, por lo que con las técnicas de NADH-TR se detecta una disminución de su capacidad oxidativa (Herrera, et al., 2001), junto con pérdida de la actividad de la mATPasa por modificaciones de los filamentos de miosina, por lo que pierden toda la actividad miosínica (Lynnch, et al., 2001),.

Pero sin duda alguna la hipertrofia de las fibras musculares por la acción de los anabolizantes, y sobre todo por los $\beta 2$ -agonistas, se debe a un aumento de la síntesis proteica relacionada con la formación de miofilamentos que a su vez estructuran las miofibrillas, este aumento del material contráctil provoca un aumento del tamaño de las fibras musculares (Choo, et al., 1990). Pero el aumento de estas miofibrillas puede mantener una disposición correcta en las fibras musculares sin mostrar modificaciones secundarias (Choo, et al., 1990), o por el contrario, aunque éstas se organicen correctamente sus miofibrillas se pierdan las relaciones entre estos componentes contráctiles, por lo que se puede afectar su funcionamiento

(Huang, et al., 2000), e incluso se puede modificar la localización del sistema tubular y del retículo sarcoplásmico.

Dentro de las alteraciones de las fibras musculares modificadas por un aumento de las miofibrillas se describe, en casos muy agudizados, una pérdida de la relación del continente y el contenido que lleva a mostrar formas atípicas y a veces monstruosas de estas fibras hipertrofiadas (Chen, et al., 2000). Y debido al gran tamaño que llegan a tener, estas fibras para favorecer su nutrición pueden incluso llegar a canalizarse (Maltin, et al., 1990). En los tratados de patología se cita que cada núcleo regula una porción concreta del citoplasma, por lo que cuando la célula en general se hipertrofia este aumento en su tamaño va acompañado por un aumento en el número de sus núcleos para dirigir los procesos metabólicos de las células hipertrofiadas (Kilt, et al., 1989). Esto ocurre en las fibras musculares tratadas con disruptores, hasta el punto que para poder dirigir el metabolismo de las fibras hipertrofiadas no sólo aumentan el número de sus núcleos sino que también modifican su localización centralizando los componentes nucleares (Hayes, et al., 1997 y Lavoie, et al., 2002).

La acción de los disruptores provoca una mejora de la masa muscular, pero con claras alteraciones, lo que provoca que el animal se haga sedentario lo que favorece aun más su engorde (Horne, et al., 1990).

La atrofia de las fibras musculares se produce al retirarse de los tratamientos de disruptores, detectándose modificaciones tanto al microscopio óptico como electrónico (Huang, et al., 2000), alterándose gravemente su actividad enzimática, como es su actividad mATPasa y la NADH-TR, por lo que se modifican los tipos de fibras musculares, e incluso se cita la aparición de un cuarto tipo de fibras de reacciones inespecíficas.

3.3.5. El uso de monocitos medulares.

El conjunto de células formado por los precursores de la médula ósea, los monocitos circulantes en la sangre y los macrófagos tisulares, se denomina sistema fagocítico mononuclear.

Los macrófagos reciben diferentes nombres según el lugar donde se encuentren, debido a que históricamente no se reconocían como el mismo tipo celular. Así, los macrófagos se llaman:

Osteoclastos: son los macrófagos del hueso, se encuentran principalmente en las trabéculas del hueso esponjoso.

Microglía: es el conjunto de los macrófagos del sistema nervioso central.

Células de Kupffer: son los macrófagos del hígado.

Células espumosas: son las células dominantes de la aterosclerosis, los macrófagos al fagocitar el colesterol cambian su estructura y se convierten en estas.

Célula gigante de Langhans: macrófago formado por la fusión de células epitelioides, presente en las enfermedades de tipo granulomatoso.

Histiocito: son los macrófagos del tejido conjuntivo.

Células mesangiales intraglomerulares: son los macrófagos del riñón.

Macrófagos alveolares o células de polvo): son los macrófagos de los alveolos pulmonares.

Los monocitos en sangre es uno de los tipos de leucocitos (glóbulos blancos) que existen en la sangre. Se ha determinado científicamente que entre el 2 y el 10% de los leucocitos son monocitos.

Forman parte del sistema inmunológico del cuerpo humano y circulan por la sangre antes de entrar en los tejidos, convirtiéndose en células dendríticas.

Son células que protegen al organismo de los ataques de virus, bacterias y agentes externos. Desempeñan su labor eliminando los microorganismos extraños así como eliminando las células muertas.

Una vez llevada a cabo su misión, dichas células mueren de forma automática, el promedio de vida que tienen es de tres días.

Como desventaja cuentan, que en ocasiones son culpables de enfermedades como artritis o aterosclerosis.

Los monocitos se producen en la médula ósea con células madre mediante el proceso denominado mielopoyesis.

Dependiendo del nivel de salud de un paciente, los monocitos representan entre el 3-7% de los glóbulos blancos totales en el cuerpo. El recuento normal de monocitos es por lo general entre 100 y 800/ μ L para un adulto y entre 400 y 3100/ μ L para un recién nacido.

Normalmente, cuando se solicita un recuento de monocitos, el laboratorio también se ejecutan otras pruebas en la sangre para generar una imagen completa. Los cambios en sus niveles pueden indicar cambios en la salud de un paciente. Como regla general, un bajo recuento de monocitos es una buena señal, y un recuento alto indica que un problema está presente.

Monocitos altos. Los niveles de monocitos en la sangre tienden a aumentar cuando alguien tiene una infección, debido a que más de estas células se necesitan para luchar contra ella. También pueden aumentar en respuesta al estrés y otros factores. Esta condición puede ser denominada como monocitosis.

Monocitos bajos. Un bajo conteo de monocitos puede ocurrir por varias razones, incluyendo enfermedades físicas, el uso de ciertos medicamentos, o deficiencias vitamínicas. Esta condición se conoce como monocitopenia.

Los valores normales pueden variar ampliamente, por lo que es importante para los pacientes para discutir los resultados de los análisis de sangre con los médicos, en lugar de tratar de descifrar a cabo por su cuenta.

Estas células se producen en la médula ósea, a partir de los monoblastos. Circulan en el torrente sanguíneo durante aproximadamente de uno a tres días y luego se almacenan en los tejidos de todo el cuerpo. La mitad de ellos se almacenan como reserva en el bazo. En los tejidos, los monocitos maduran hasta convertirse en células dendríticas o macrófagos.

Las células dendríticas pertenecen a un grupo de células conocidas como antígenos que presentan piezas de patógenos a las células T para que puedan ser reconocidos de nuevo y asesinados. Las células dendríticas típicamente presentan antígenos a las células T antes de que se han desarrollado completamente, de modo que la célula T puede responder apropiadamente después de que se ha demostrado que un antígeno.

Los macrófagos son células que se comen a otras células. Clásicamente, atacan cualquier material extraño, tal como bacterias o virus, consumiéndolo de manera

que no puede dañar el cuerpo y la preservación de un antígeno de manera que el cuerpo será capaz de reconocer el material extraño en el futuro. Los macrófagos también pueden comer las células en el cuerpo que han sido infectadas por un patógeno, para frenar la propagación del agente patógeno y mantener el cuerpo saludable.

Los monocitos son un tipo de glóbulos blancos agranulocitos. Es el leucocito de mayor tamaño, llegando a medir 18 μm , y representa del 2 al 8 % de los leucocitos en la sangre. El sistema fagocítico mononuclear (SFM) está constituido por los monocitos circulantes y los macrófagos tisulares. Los promonocitos de la médula ósea, al madurar salen de ella, diferenciándose en monocitos circulantes, que al cabo de unas 8 horas emigran a distintos tejidos, donde se convierten en macrófagos.

Como características destacables, presenta un núcleo en general arriñonado, lobulado o cerebriforme, que se tiñe irregularmente en forma de "rejilla" o reticular de color violeta-azulado. Usualmente el núcleo guarda una proporción de 2:1 en área con respecto al citoplasma que lo rodea, y muy frecuentemente presenta una depresión profunda. El citoplasma es abundante y de color gris azulado pudiendo estar acompañado de vacuolas blanquecinas.

Los monocitos se generan en la médula ósea y después viajan por la sangre, para luego emigrar a diferentes tejidos como hígado, bazo, pulmones, ganglios

linfáticos, huesos, cavidades serosas, etc. Después de alrededor de 24 horas de permanecer en el torrente sanguíneo, los monocitos lo abandonan y atraviesan el endotelio de los capilares o las vénulas poscapilares hacia el tejido conectivo, donde se diferencian rápidamente a macrófagos.

Su principal función es la de fagocitar, es decir, comerse a diferentes microorganismos o restos celulares. Para fagocitar se tienen en cuenta diversos factores como la presencia de antígenos. No obstante, el procedimiento es sencillo, y consiste en rodear con los pseudópodos la molécula, acción que es inhibida en los casos en que el macrófago reconoce a la célula como integrante de un tejido propio del organismo, por medio de las proteínas del CMH (complejo mayor de histocompatibilidad) presentes sobre las membranas celulares.

Los macrófagos (gr. "gran comedor") son células del sistema inmunitario que se localizan en los tejidos. Proceden de células precursoras de la médula ósea que se dividen dando monocitos (un tipo de leucocito), que tras atravesar el epitelio de los capilares y penetrar en el tejido conjuntivo se convierten en macrófagos. Pueden ingerir y destruir bacterias, células dañadas y eritrocitos gastados. Este proceso se llama fagocitosis.

Los macrófagos son un tipo de glóbulo blanco.

Tiene como función principal el envolver y digerir algunos microorganismos. Entre los principales microorganismos que digiere están los desechos celulares, sustancias extrañas, microbios, células cancerosas, entre otras.

Los organismos llamados fagocitos están en todos los tejidos del ser humano. En estas zonas “patrullan” en búsqueda de posibles patógenos por movimiento de ameboides.

De igual forma, los fagocitos toman diferentes formas en todo el cuerpo humano, pese a que todos forman parte del sistema de los fagocitos mononucleares.

Los macrófagos también cumplen funciones en el sistema inmunológico, tanto en la inmunidad innata como en la inmunidad adaptativa.

Estas células también sirven como presentadores de antígenos para las células T. Cuando hay una disfunción en los macrófagos se pueden causar enfermedades graves. Un ejemplo de ello es la enfermedad granulomatosa crónica que origina infecciones frecuentes.

Estas células sirven para aumentar la inflamación y estimular el sistema inmune.

Sin embargo, los macrófagos también cumplen una función importante como antiinflamatorios. Aunado a ello también pueden disminuir las reacciones inmunes mediante la liberación de citoquinas.

Su denominación (nombre) puede variar dependiendo de su función en el organismo.

Los Macrófagos M1 estimulan la inflamación. Tienen a su vez la capacidad de metabolizar arginina a las moléculas de óxido nítrico. Mientras tanto, los macrófagos M2 tienen la capacidad de reparar los tejidos y disminuir la inflamación; de igual forma cumplen una función importante para metabolizar la arginina a las moléculas de ornitina.

Estas células suelen residir en tejidos sanos adultos. Derivan de monocitos circulantes o pueden llegar a establecerse incluso antes del nacimiento. Si este es el caso, se mantienen durante la vida adulta en plena dependencia con los monocitos.

Por otra parte, cuando la mayoría de estos macrófagos se acumulan en sitios enfermos, por lo general derivan de monocitos circulantes.

Cuando un monocito se introduce en el tejido dañado mediante el endotelio de un vaso sanguíneo, surge un proceso llamado “extravasación de leucocitos”. Este proceso sufre una serie de cambios hasta convertirse en un macrófago.

Luego, los monocitos son atraídos por un sitio dañado por sustancias químicas a través de la quimiotaxis. Esta última se desencadena por diferentes estímulos que incluyen células dañadas, patógenos y citoquinas liberadas por los macrófagos.

Se diferencian de los neutrófilos de vida corta, puesto que estas células no viven tanto tiempo como los macrófagos que duran meses en el organismo.

Un macrófago es, básicamente, un fagocito profesional.

En ese sentido, están especializados en la eliminación de células muertas y restos celulares. Dicho papel es importante en la inflamación crónica, puesto que las etapas tempranas de la inflamación suelen estar dominadas por neutrófilos; estos a su vez son ingeridos por algún macrófago si alcanzan la mayoría de edad.

Fagocitosis

La fagocitosis se conoce como un proceso del organismo. En este proceso diversas células pueden digerir y capturar partículas nocivas o diferentes alimentos.

En este caso, los neutrófilos primeros son atraídos a un sitio, donde proceden a proliferarse. Luego es que son fagocitados por un macrófago o varios.

Básicamente podemos decir que un macrófago consume o infiere un neutrófilo envejecido.

Por lo general, cuando se habla de la eliminación de las células moribundas, se maneja mediante los macrófagos fijos. Estas células suelen encontrarse en lugares fijos como los pulmones, huesos, bazo, tejido conjuntivo, tejido neural, entre otros.

Cómo es el proceso de eliminación de células moribundas

Cuando un macrófago ingiere un patógeno, este queda atrapado en un fagosoma; posteriormente se fusiona con un lisoma.

Los macrófagos son células efectoras inmune innatas más conocidas por su papel como fagocitos profesionales, que también incluyen neutrófilos y células dendríticas. La evidencia reciente indica que los macrófagos también son actores clave en la homeostasis metabólica.

Los macrófagos se pueden encontrar en muchos tejidos, donde responden a señales metabólicas y producen mediadores pro y / o antiinflamatorios para modular los programas de metabolitos.

Ciertos metabolitos, como ácidos grasos, ceramidas y cristales de colesterol, provocan respuestas inflamatorias a través de vías de señalización que detectan patógenos, lo que implica una mala adaptación de los macrófagos y el sistema inmune innato al estrés metabólico elevado asociado con la desnutrición en las sociedades modernas.

El resultado de esta mala adaptación es una respuesta inflamatoria directa que conduce a un estado de inflamación no resuelta y una colección de patologías

metabólicas, que incluyen resistencia a la insulina, hígado graso, aterosclerosis y dislipidemia.

Los procesos inflamatorios son la defensa del cuerpo contra el daño y la enfermedad local. La inflamación implica la afluencia a los órganos de las células inmunes (glóbulos blancos) de la sangre.

Estas células se ocupan de los microbios y reparan el daño tisular. Dos subtipos principales de células inmunes son células T y macrófagos. Las células T están diseñadas para reconocer las firmas moleculares de proteínas particulares, como las de las bacterias, para activar una respuesta inmune.

Los macrófagos comen otras células y son capaces de separar sus proteínas para presentarlas a las células T. Sin embargo, si las células T responden a las propias proteínas, puede producirse una inflamación inapropiada que puede dañar los órganos sanos.

Esto se conoce como enfermedad autoinmune. Dicha inflamación es particularmente dañina en el ojo, ya que el daño tisular y la presión causada por el número de células inmunes que ingresan, interrumpe la delicada organización del ojo que se requiere para la vista.

Los macrófagos interactúan con las células T para provocar la activación de las células T en los órganos diana, y se activan por las moléculas mensajeras inflamatorias (citocinas) producidas por las células T.

Los macrófagos producen químicos tóxicos, como óxido nítrico, que pueden matar las células circundantes. Se ha demostrado que los macrófagos estimulados por las células T necesitan producir una segunda citoquina inflamatoria (TNF α), que es necesaria como señal para indicar a los macrófagos que produzcan óxido nítrico.

La modulación de esto ahora se está utilizando en la clínica para tratar la enfermedad ocular inflamatoria autoinmune. Muchas otras señales (tanto productos químicos secretados como interacciones de la superficie celular) también controlan el resultado de la interacción entre los macrófagos y las células T.

Estos pueden ser objetivos importantes para la terapia médica, por lo que la investigación pretende revelar los detalles de este proceso inflamatorio, con el objetivo a largo plazo de identificar objetivos novedosos, más efectivos y más específicos para tratar enfermedades cegadoras causadas por la autoinmunidad.

Esta clasificación se basa en la polarización de los macrófagos más que en la ubicación de los macrófagos.

Los macrófagos M1: se activan clásicamente, típicamente por IFN- γ o lipopolisacárido (LPS), y producen citocinas proinflamatorias, fagocitan microbios e

inician una respuesta inmune. Los macrófagos M1 producen óxido nítrico (NO) o intermedios de oxígeno reactivo (ROI) para proteger contra bacterias y virus.

Los macrófagos M2: se activan alternativamente por exposición a ciertas citocinas tales como IL-4, IL-10 o IL-13. Los macrófagos M2 producirán poliaminas para inducir la proliferación o prolina para inducir la producción de colágeno. Estos macrófagos están asociados con la curación de heridas y la reparación de tejidos.

Los macrófagos M2 también contribuyen a la formación de la matriz extracelular y no producen óxido nítrico o antígeno presente a las células T. Los macrófagos infiltrantes de tumores se clasifican típicamente como M2, aunque algunos los clasifican como células supresoras derivadas de mieloides (MDSC).

El término macrófago fue asignado por Aschoff en 1924 a un conjunto de células componentes del sistema retículo-endotelial que está formado no solo por monocitos, macrófagos e histiocitos, sino también por fibroblastos, células endoteliales y células reticulares. Después de 1969, se definió el concepto de sistema fagocítico mononuclear, formado por una variedad de macrófagos, derivados de monocitos procedentes de la médula ósea, abandonándose el concepto de sistema retículo endotelial, que está constituido por células distintas funcional e inmunológicamente.

Los macrófagos proceden de los monocitos.² Estos se forman en la médula ósea procedentes de células pluripotenciales de la serie granulocítico-monocítica, gracias al factor de crecimiento GM-CSF (granulocyte macrophage colony stimulating factor) y otras citoquinas, como la interleucina 3 (IL-3).

Cuando estos factores de crecimiento están presentes en la médula ósea, la célula progenitora prolifera y se diferencia a promonocitos, células que en divisiones celulares posteriores producirán monocitos.

La diferenciación celular de la célula madre está asociada con la expresión de receptores de membrana para citocinas específicas. Los monocitos permanecen en la médula ósea menos de 24 horas, después pasan a la circulación sanguínea y son distribuidos por todo el cuerpo. En esta etapa, se visualizan al microscopio en los frotis de sangre periférica como células de mayor tamaño, cuyo diámetro oscila entre 15 a 30 μm y poseen una alta relación núcleo/citoplasma.

En adultos sanos normales, la vida media de un monocito circulante se estima en 70 horas y en una proporción del 1 al 6 por ciento del total de leucocitos en un recuento normal en sangre periférica.

Una vez los monocitos salen de los capilares sanguíneos y se localizan en los tejidos se transforman en macrófagos. Esta diferenciación de monocito a macrófago afecta a gran cantidad de cambios como que la célula aumenta su tamaño de 5 a 10

veces, sus orgánulos incrementan tanto su número como su complejidad, adquiere capacidad fagocítica, produce altas concentraciones de enzimas líticas y empieza a secretar gran variedad de sustancias solubles que realizan diferentes funciones.

Los macrófagos están habitualmente en estado de reposo, pueden ser activados por gran variedad de estímulos durante la respuesta inmune. La fagocitosis de antígenos sirve como estímulo inicial; sin embargo, los macrófagos y su actividad pueden aumentarse por citocinas secretadas por linfocitos T colaboradores, o mediante el contacto con los mismos. Uno de los más potentes activadores de macrófagos es el interferón gamma. También son capaces de reconocer patrones moleculares asociado a patógenos.

La función principal de los macrófagos es la de fagocitar todos los cuerpos extraños que se introducen en el organismo como las bacterias y sustancias de desecho de los tejidos. Los macrófagos son fagocitos junto con los neutrófilos y otras células. Los macrófagos tienen la capacidad de quimiotaxis, es decir la de ser atraídos y desplazados hacia una determinada localización por la presencia de determinados factores quimiotácticos para monocitos como interleucina-I, trombina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor del complemento C5a, fragmentos de colágeno, elastina, fibronectina, calicreína, activador del plasminógeno, inmunoglobulinas y leucotrienos.

Inflamación: Los macrófagos forman parte del sistema inmunitario innato, es decir, inician una respuesta natural contra los microorganismos, porque los macrófagos expresan receptores de membrana para numerosas moléculas bacterianas, por ejemplo: receptor para lipopolisacáridos (CD14), receptores C11b/CD18, receptores para manosas, y receptor para glúcidos entre otros. Los macrófagos de los vertebrados y de los invertebrados participan en gran medida de la respuesta inmune innata a infecciones gracias a sus receptores scavengers o barredores, que poseen una especificidad a ligandos muy amplia como: lipoproteínas, proteínas, poli y oligonucleótidos, polisacáridos aniónicos, fosfolípidos y otras moléculas.

Presentación de antígenos: cuando los macrófagos fagocitan un microbio, procesan y sitúan sus antígenos en la superficie externa de su membrana plasmática, donde serán reconocidos por los linfocitos T colaboradores; tras el reconocimiento, los T producen linfoquinas que activan a los linfocitos B. Por eso los macrófagos forman parte de las llamadas células presentadoras de antígenos, ya que poseen en sus membranas moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase II. Los linfocitos B activados producen y liberan anticuerpos específicos a los antígenos presentados por el macrófago. Estos anticuerpos se adhieren a los antígenos de los microbios o de células invadidas por virus y así atraen con mayor avidez a los macrófagos para fagocitarlos.

Reparación de tejidos: Los macrófagos además ingieren células muertas del anfitrión y participan en la reparación de tejidos dañados tras la reacción inmunitaria.

Hemostasia: el macrófago produce una serie de sustancias que participan en la coagulación como son: proteína C, trombomodulina, factor tisular, factor VII, factor XIII y el inhibidor del activador del plasminógeno.

4. Material y métodos

4. Material y métodos

4.1. Animales utilizados

Se utilizaron 16 cerdos “*Minipig*” de 2 meses de edad, en buen estado de salud y sin historial de enfermedades previas (fig. 11).

El procedimiento experimental se realizó en el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Córdoba (SAEX), centro registrado como establecimiento de cría, suministrador y usuario de animales de experimentación y otros fines científicos. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité de Bioética de la Universidad de Córdoba y se realizaron cumpliendo en todo momento las directrices del Real Decreto 53/2013 de 1 de febrero sobre protección de los

animales utilizados para experimentación y otros fines científicos, así como la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 22 de septiembre de 2010, relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos.

Los animales fueron alimentados una vez al día durante los meses de estudio (Nantaunic, Nantaporc PI®).



Figura 11. Modelo experimental: *Minipig*

4.2. Protocolo y diseño experimental.

Los *Minipig* se distribuyeron al azar a uno de los cuatro grupos experimentales: Grupo control (GC), (n=4), el grupo tratado con BPA (n=4) oralmente con 1 mg/kg/día (*Sigma Aldrich*®, St. Luis, EE.UU.) durante cuatro meses, un tercer grupo BPA-retirada (n=4) a los que tras dos meses de tratamiento se le retiró el BPA durante otros dos meses hasta la biopsia. Y un cuarto grupo tratados con Células Mononucleadas medulares (CMNs) (n=4), a los animales de este último grupo se les trató con BPA durante 2 meses, después se le retiró y comenzó el tratamiento con CMNs (Tabla 4).

El tratamiento con CMNs se realizó mediante la inyección en los músculos *longissimus lumbaris* y *longissimus dorsis* mediante una aguja de biopsia percutánea (fig. 12), una dosis semanal de CMNs, durante dos meses.

Al acabar los distintos periodos de exposición, tratamiento y/o retirada según el grupo de estudio, se recogieron muestras mediante biopsia de fibras musculares de ambos, para su posterior estudio.

GRUPOS	TRATAMIENTOS	Nº <i>MINIPIG</i>
1	CONTROL	4
2	GRUPO BPA 1mg/kg/día BPA durante 4 meses	4
3	GRUPO RETIRADA BPA 1mg/kg/día BPA durante 2 meses y retirada 2 meses	4
4	GRUPO CMNs 1 mg/Kg/día CMNs durante 2 meses y retirada 2 meses tratado con CMNs	4

Tabla 4. Distribución de grupos y tratamientos

4.3. Toma de muestras

Para la toma de muestras de tejido se utilizaron aguja de biopsias desechable, Agoram® de 20 mm diámetro y 200 mm de larga con punta Franseen indicada para

biopsias micro-histológicas con un nivel mínimo de invasividad. Se obtiene una biopsia citológica de los músculos *longissimus lumbaris* y *longissimus dorsi*, por medio de aspiración conectando una jeringa a la cánula de la aguja es graduada para alcanzar el máximo nivel de precisión. Para ello se realiza una incisión pequeña en la piel de 2 a 3 mm bajo anestesia local, se introduce una aguja de 4 mm hasta alcanzar la masa muscular, y se aspira.



Figura 12. Aguja de biopsia Agoram®

4.4. Obtenciones y evaluaciones de los cultivos de monocitos (CMNs).

4.4.1. Aislamiento de céluas Mononucleadas derivadas de Médula Ósea.

Las CMNs fueron extraídas de medula osea procedentes de la epífisis fémur y la tibia de minipig sano.

El procedimiento se inició con el sacrificio del animal. Una vez extraídos el fémur y la tibia, se realizaron varios lavados de la cavidad interior con suero salino heparinizado y antibiótico (0.1mg/mL estreptomicina, 100UI/mL penicilina) para obtener la MO de la cavidad ósea. De la suspensión medular obtenida se eliminaron los restos de tejido no medular por centrifugación y se filtró con membranas de filtración de tamaño de poro 70µm y 40µm (de BD Biosciences). Los componentes de la suspensión medular fueron separados por centrifugación en gradiente de densidad en Ficoll-Hypaque de Lymphoprep™ (Oslo, Norway) de densidad 1.077 g/cm³. A la fracción de células mononucleadas obtenida se le determinó la viabilidad con Azul Tripán (Lonza, Verviers, Belgium) y se realizó el recuento celular en cámara de Neubauer. Las células fueron resuspendidas a una concentración de 5×10⁶ CMNs/mL de solución de suero fetal bovino

(FBS) y DMSO al 10% para su congelación en un equipo CRYOMED Mod.8027 (Forma Scientific) y criopreservación a -196°C de temperatura en nitrógeno líquido. Se elaboró una citoteca en la cual quedaron registradas todas las muestras de CMNs obtenidas, que permanecieron congeladas hasta la realización del estudio de caracterización celular para su administración como tratamiento de la MCD inducida en minipig en el estudio in vivo.

4.4.2. Aislamiento y expansión de Células Mesenquimales derivadas de tejido Adiposo de donantes sanos

Las MSCs fueron aisladas a partir de tejido adiposo (TA) subcutáneo localizado en la zona inguinal y peritoneal de minipig sanos.

El tejido adiposo se extirpó según procedimiento validado por la literatura (Ref A. Wei X), se troceó en pequeñas porciones con cuchilla estéril en placa de petri y se centrifugó para la separación del estroma del tejido graso de la fracción adipocítica madura. La fracción del estroma adiposo se incubó en solución de Colagenasa tipo I (Sigma Aldrich) a una concentración de 0,5U de enzima/mL por gr. de TA para su completa disgregación. Finalizada la incubación, se neutralizó la acción de la enzima

con FBS y se centrifugó, resuspendiendo el pellet final en solución salina heparinizada con antibiótico (0.1mg/mL estreptomicina, 100UI/mL penicilina). La suspensión celular final resultante se filtró para eliminar los restos de tejido no disgregado en membranas de filtración de tamaño de poro 100µm y 40µm (de BD Biosciences).

La suspensión celular final se resuspendió en 1mL de medio de cultivo mínimo basal (α-MEM) enriquecido al 15% con FBS, ultra-glutamina (2mM), antibióticos (0.1mg/ml estreptomicina, 100UI/ml penicilina) y factor de crecimiento de fibroblastos-tipo 2 (FGF-2, Sigma Aldrich) (1ng/mL). Se determinó la viabilidad por el método de tinción por exclusión con Azul Tripán (Lonza, Verviers, Belgium) y el recuento del número de células en cámara de Neubauer. La suspensión celular obtenida se sembró en frascos de cultivo Nunc de 75 cm² (Nunc EasYFlask, Thermo Scientific) a una densidad de $5,3 \times 10^4$ células/cm² en 15mL medio α-MEM completo. El cultivo se incubó a 37°C de temperatura en atmósfera humidificada al 5% de CO₂ durante 24h. Finalizada dicha incubación, se renovó el medio de cultivo por medio fresco, incubando y renovando el medio cada 72h hasta obtener una confluencia del cultivo celular del 80% aproximadamente. En este punto, las células fueron tripsinizadas con solución Tripsina/EDTA (ReagentPack™ Subculture Reagents, Lonza) neutralizando la acción de la

enzima con solución neutralizante TNS (ReagentPack™ Subculture Reagents, Lonza) y lavando con PBS por centrifugación. El pellet final se resuspendió en 1mL de medio de cultivo α -MEM completo, se determinó la viabilidad con Azul Tripán y el recuento celular en cámara de Neubauer y se sembró de nuevo en frascos de 75cm² a una densidad de $6,7 \times 10^3$ células/cm². Este pase del cultivo fue considerado como Pase 0 y se repitió todo el proceso hasta tener MSCs cultivadas en Pase 1, 2, 3, 4 y 5.

Las células sobrantes de la siembra de los cultivos se resuspendieron en solución de DMSO diluido al 10% en FBS a una concentración de 5×10^6 MSCs/mL para su congelación en un equipo CRYOMED Mod.8027 (Forma Scientific) y su posterior criopreservación a -196°C de temperatura en nitrógeno líquido. Se elaboró una citoteca en la que se registraron todas las muestras de MSCsTA obtenidas, cada una procedente de una rata única, que permanecieron congeladas hasta la realización del estudio de caracterización celular para la administración como tratamiento de la MCD inducida en rminipig en el estudio in vivo.

4.5. Caracterización morfológica de células mononucleadas y células mesenquiales

La caracterización morfológica de las CMNs se realizó por microscopía electrónica de transmisión.

La caracterización morfológica de las MSCs fue realizada por microscopía electrónica de barrido y por microscopía electrónica de transmisión sólo en aquellas poblaciones de MSCs que fueron seleccionadas como tratamiento para el estudio in vivo: MSCsMO en pase 2 de cultivo (MSCsMOp2) y MSCsTA en pase 5 (MSCsTAp5).

Previo al procesamiento de las muestras, las suspensiones celulares fueron descongeladas siguiendo el mismo protocolo anteriormente descrito (pto 2.5) y resuspendidas en PBS. De cada una de las muestras se realizó un frotis para evaluar la integridad celular tras el proceso de descongelación. Para ello se colocó una gota de la suspensión celular sobre el porta, se extendió en forma de fina capa, se dejó secar a temperatura ambiente, se añadió unas gotas de metanol frío para fijar las células y éstas fueron teñidas con Giemsa. Las preparaciones celulares teñidas fueron observadas bajo un microscopio Nikon

Eclipse TE2000-S ubicado en la Unidad de Terapia Celular del HURS, con objetivo de 40×.

4.5.1. Caracterización por microscopía electrónica de transmisión

Para el análisis de las distintas muestras por microscopía electrónica de transmisión, las suspensiones celulares (CMNs, MSCsMOp2 y MSCsTAp5) se resuspendieron en glutaraldehído al 2,5% y tetróxido de osmio al 1% como fijadores, se deshidrataron con distintas soluciones de etanol de concentraciones crecientes y se incluyeron en resina epoxi para la formación de un bloque compacto. En los distintos bloques se realizaron cortes ultrafinos de 0,1µm de grosor con un ultramicrotomo LKB III que se colocaron sobre rejillas de cobre y níquel y se contrastaron con uranilo saturado y citrato de plomo.

La caracterización morfológica de las distintas muestras procesadas se realizó a través del microscopio electrónico Jeol Jem 1400 (Jeol, Japón) de alta resolución ubicado en el SCAI del campus universitario de Rabanales en Córdoba, mediante el análisis detallado de las imágenes adquiridas en modo .tiff a través del software de adquisición de imágenes para su

microanálisis Inca energy 200 tem y Aztec, acoplado al propio equipo. Un total de 20 imágenes fueron adquiridas por cada muestra procesada.

4.5.2. Caracterización por microscopía electrónica de barrido

Para la caracterización morfológica de las MSCs por microscopía electrónica de barrido las células fueron sembradas en cultivo en placas de 6 pocillos (BD Falcon™).

En cada uno de los pocillos de las placas, previo a la siembra de las MSCs, se colocó un cubre estéril de plástico Thermanox de 22mm de diámetro (Thermo Scientific, Nunc, USA). Un total de $6,4 \times 10^4$ de MSCs fueron sembradas por pocillo en 2mL de medio α -MEM completo e incubadas a 37°C de temperatura en atmósfera humidificada y 5% de CO₂ hasta alcanzar el cultivo una confluencia celular del 90-95%, renovando el medio cada 72 horas.

Finalizado el cultivo, del fondo de cada pocillo se retiró el cubre de plástico con las MSCs adheridas.

Estas células adheridas al cobre fueron fijadas con solución de glutaraldehído al 2,5%, deshidratadas en distintas soluciones de acetona de concentraciones crecientes y recubiertas con oro coloidal en un sombreador BAL-TEC SCD005 ubicado en el SCAI del campus universitario de Rabanales en Córdoba.

La caracterización morfológica de las distintas muestras procesadas se realizó a través del microscopio electrónico de barrido Jeol JSM 6300 de alta resolución, ubicado en el SCAI del campus universitario de Rabanales en Córdoba, mediante el análisis detallado de las imágenes adquiridas.

La adquisición de imágenes se realizó a través del software de microanálisis X-act 80 acoplado al propio equipo. Un total de 20 imágenes fueron adquiridas en los tres aumentos disponibles del microscopio: 270x, 330x y 600x.

4.6. Estudio histopatológico estructural y ultraestructural.

4.6.1. Microscopio óptico

Para el estudio estructural de la muestras se siguieron las siguientes pautas:

- **Fijación**

En este paso el tejido obtenido se coloca en una sustancia fijadora, generalmente líquida, para evitar los cambios post-mortem y para lograr conservar la forma original del tejido. Unos de los fijadores más usado es el formol al 10% (formaldehído).

En el caso de que utilicemos más adelante el microscopio electrónico, usaremos:

- **Lavados**

Se debe lavar el tejido para quitar el exceso de fijador (químico). El exceso de fijador al momento de la infiltración, incluso en la microtomía, podría afectar los cortes histológicos, y por ello se debe lavar con agua destilada.

La deshidratación se hace empleando diferentes soluciones de alcohol de concentración creciente.

- **Aclaramiento**

En este paso se sustituye el alcohol por un disolvente de parafina. El más usado es el xilol (xileno) ya que como la muestra está deshidratada, el xilol entrará hasta lo más profundo del tejido. También el tejido pierde color y adquiere un tono acaramelado.

- **Infiltración**

En este paso la muestra se coloca en parafina líquida, cabe mencionar que se debe usar parafina histológica. Como se ha dicho en el paso anterior el tejido está completamente lleno de xilol, ahora debido a ósmosis sale el xilol y entra la parafina.

La deshidratación, aclaramiento e infiltración pueden ser realizadas manualmente pero hoy en día se realizan de modo automático en máquinas específicas.

- **Inclusión**

Tiene como finalidad proporcionarle al tejido un soporte sólido que posibilite realizar un corte muy fino, por lo que es de suma importancia que el medio utilizado para la inclusión penetre al interior del tejido. Aquí se forman bloques de parafina dentro de los cuales están las muestras a

estudiar. También hay máquinas especializadas para la inclusión en parafina de tejidos. Después de su inclusión y posterior secado, estos se deben poner a enfriar en un congelador para su posterior corte. Puede llevarse a cabo en Parafina.

- **Microtomía**

Se realizan cortes histológicos muy delgados según lo requerido o la costumbre del laboratorio donde se realice la técnica. Los cortes van desde 0,5 micras hasta 8 u 10 micras. Los cortes se echan al baño de flotación y se 'pescan' con un portaobjetos, se marcan con la fecha, el tipo de tejido y la tinción con que se van a procesar. El ángulo de corte entre el cuchillo del microtomo y el bloque ha de estar entre 10° y 15°. Una vez realizado el corte se da un baño de agua destilada, para que la parafina se estire. Un buen corte histológico debe tener un grosor aproximado de 3-5 micras para que sea fácilmente atravesado por la luz del sol y atraviese los poros celulares.

Técnicas de tinción usadas: Las técnicas usadas para el estudio de los músculos al microscopio óptico han sido las siguientes:

TÉCNICA TRICRÓMICO DE MASSON

Se trata de una técnica para la demostración de fibras colágenas.

Fijación: cualquier fijador es válido, si bien es de elección la solución de Bouin.

Cortes: en parafina. MODO DE OPERAR tras la obtención de los cortes:

XILENO	10 MIN
XILENO	10 MIN
ALCOHOL 100	5 MIN
ALCOHOL 100	5 MIN
ALCOHOL 96	5 MIN
ALCOHOL 96	5 MIN
LAVAR CON AGUA CORRIENTE	5 MIN
SOLUCIÓN DE BOWIN A 56-60°	1 HORA ESTUFA
LAVAR EN AGUA CORRIENTE HASTA QUE DESAPAREZCA EL COLOR AMARILLO - LAVAR EN AGUA DESTILADA - HEMATOXILINA DE IRUM	10 MIN
LAVAR EN AGUA CORRIENTE	10 MIN
LAVAR CON AGUA DESTILADA	--
SOLUCIÓN DE BRIEBRICH-SCARLET FUCSINA ÁCIDA	5 MIN
LAVAR CON AGUA DESTILADA - SOLUCIÓN DE ÁCIDO FOSFOTUNGSTICO ACUOSO 5%	15 MIN
SOLUCIÓN VERDE LUZ	20 MIN
LAVAR CON AGUA DESTILADA	--
SOLUCIÓN DE AGUA ACÉTICA AL 1%	4 MIN
PASAR POR AGUA CORRIENTE	--
ALCOHOL 96	5 MIN
ALCOHOL 96	5 MIN
ALCOHOL 100	5 MIN
ALCOHOL 100	5 MIN
XILENO Y MONTAR	

Resultados:

- a. Núcleos: Azul negruzco

- b. Citoplasmas, queratina, fibras musculares: Rojo
- c. Colágeno y reticulina: Azul o verde

TÉCNICA HEMATOSILINA-EOSINA

La hematoxilina es un colorante catiónico mientras que la eosina es un colorante aniónico perteneciente a los xantenos. Se teñirán los núcleos de azul, citoplasmas en rosa, músculo en tonos rojizos a rosados fucsia, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso. tonos rojizos a rosados fucsia, glóbulos rojos en naranja o rojo y la fibrina en rosa intenso.

1º-Desparafinado. <ul style="list-style-type: none">▪ Estufa durante 30 min. a 60°.▪ Sumergimos en xilol durante 10 o 15 min.	5º- Lavar en H2O-2min.
2º- Hidratación. <ul style="list-style-type: none">▪ Alcohol absoluto-5min.▪ Alcohol 96°-5min.▪ Alcohol 70°-5min.	6º-Eosina alcohólica-1min.
3º- Lavar en H2O destilada.	7º-Deshidratar. <ul style="list-style-type: none">▪ Alcohol de 70°▪ Alcohol de 96°.▪ Alcohol absoluto.▪ Xilol.
4º- Hematoxilina-5min.	8º- Montaje.

Protocolo:

Las muestras se dejan en la estufa, por lo menos 10 minutos a 60°C o toda la noche a 37°C (desparafinación).

- Xilol, 3 pasos de 5 a 10 minutos (final desparafinación).
- Etanol, por lo menos 3 pasos, habitualmente 96°, 80°, 70°, de 3 a 5 minutos.-Acabar con un paso de agua (hidratación).
- La hematoxilina se debe filtrar antes de empezar.
- Hematoxilina durante 3-5 minutos.
- Llevar la cubeta a la pila.
- Lavar la muestra en una cubeta con agua corriente de forma que rebose y eliminar el exceso de colorante.
- La muestra se sumerge y se saca rápidamente en una cubeta con alcohol clorhídrico (0.5% de HCl en etanol absoluto) varias veces, para eliminar el exceso de coloración en la muestra (diferenciación).
- Se neutraliza el ácido sumergiendo la muestra en agua corriente durante 2 minutos.
- Lavar con agua corriente durante varios minutos. Pasar por agua destilada antes de -Las muestras se dejan en la estufa, por lo menos 10 minutos a 60°C o toda la noche a 37°C (desparafinación).
- Xilol, 3 pasos de 5 a 10 minutos (final desparafinación).

- Etanol, por lo menos 3 pasos, habitualmente 96°, 80°, 70°, de 3 a 5 minutos. -Acabar con un paso de agua (hidratación).
- La hematoxilina se debe filtrar antes de empezar.
- Hematoxilina durante 3-5 minutos.
- Llevar la cubeta a la pila.
- Lavar la muestra en una cubeta con agua corriente de forma que rebose y eliminar el exceso de colorante.
- La muestra se sumerge y se saca rápidamente en una cubeta con alcohol clorhídrico (0.5% de HCl en etanol absoluto) varias veces, para eliminar el exceso de coloración en la muestra (diferenciación).
- Se neutraliza el ácido sumergiendo la muestra en agua corriente durante 2 minutos.
- Lavar con agua corriente durante varios minutos. Pasar por agua destilada antes de seguir.
- Sumergir la muestra en Eosina durante 3-5 minutos.
- Baño rápido con agua.
- Etanol, por lo menos 3 pasos, habitualmente 70°, 80°, 96°, de 3 a 5 minutos. --Acabar con 3 pases de 100% (deshidratación).
- Se acaba en xilol, en 2 o 3 cubetas, de 30 segundos a 5 minutos.
- Montar de manera habitual.

Seguir.

- Sumergir la muestra en Eosina durante 3-5 minutos.
- Baño rápido con agua.
- Etanol, por lo menos 3 pasos, habitualmente 70°, 80°, 96°, de 3 a 5 minutos. -Acabar con 3 pases de 100% (deshidratación).
- Se acaba en xilol, en 2 o 3 cubetas, de 30 segundos a 5 minutos.
- Montar de manera habitual.

4.6.2. Microscopio electrónico de transmisión (MET)

Muestras de varios milímetros de fibra muscular fueron tomadas para su estudio ultraestructural. Dichas muestras fueron fijadas en glutaldehído al 2% en solución 0,1 M de buffer fosfato (ph 7,4) a 4° C durante 12 horas y posteriormente se refijaron en tetróxido de osmio en solución 0,1 M de buffer fosfato (ph 7,4) durante 30 minutos, según el proceder de Sabbatini y colaboradores (1964). Después se procedió a un lavado con solución buffer fosfato (ph 7,4) seguido de una deshidratación en escala ascendente de alcoholes finalizando con la inclusión de las piezas se incluyeron en Araldita.

Los cortes semifinos y ultrafinos se realizaron en un ultramicrotomo LKB. Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina, mientras que en los cortes ultrafinos se realizó un doble contraste con acetato de uranilo y citrato de plomo. Para su estudio ultraestructural los cortes fueron observados y

electronografiados en un microscopio electrónico de transmisión JEM 1400, del Servicio de Microscopia Electrónica de la Universidad de Córdoba (Fig. 11).

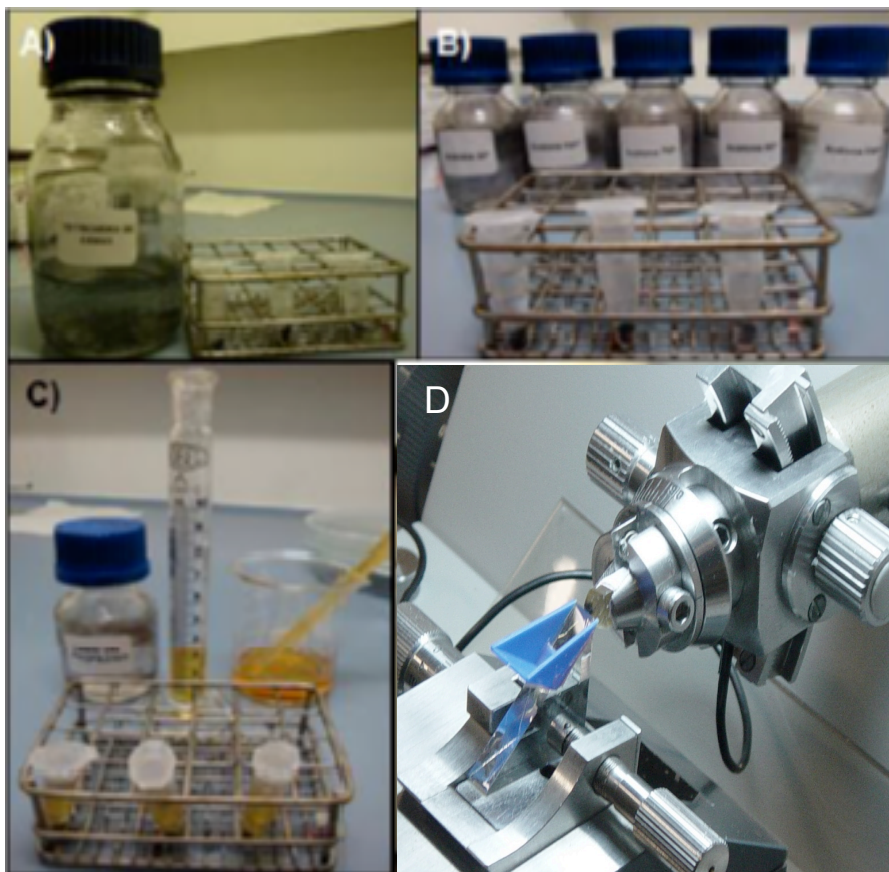


Figura 13. Preparación de las muestras para su observación en el microscopio electrónico de transmisión: A) Fijación de las muestras en tetróxido de osmio — solución 0.1 M de tampón fosfato (pH 7.4) — durante 30 min. B) Deshidratación en escala ascendente de alcoholes. C) Inclusión en araldita. D) Realización de cortes semifinos y ultrafinos en un ultramicrotomo LKB.



Figura 14. MET empleado para el estudio y fotografía de los cortes.

MET JEOL JEM – 1400. Del Área de Microscopía del Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba.

4.7. Técnicas histoenzimáticas

▪ Técnica ATPasa miosínica

Aplicamos estas técnicas a fin de detectar mediante microscopía óptica la presencia o ausencia ATPasa por parte de la miosina de las fibras musculares.

Para ello las preparaciones se incuban en una solución que contiene ATPasa y calcio a pH 9.45. A este pH la enzima ATPasa libera el fosfato terminal que combina con el calcio de la solución formando fosfato cálcico insoluble a pH básico, que precipitará en el lugar donde reside la actividad enzimática. A continuación las preparaciones se trasladan a una solución de cloruro de cobalto. El cobalto sustituye al calcio en el fosfato de calcio, y el fosfato de cobalto resultante precipita en el mismo sitio. Por último sometemos las preparaciones de tejido muscular a una solución de sulfuro de amonio formándose sulfuro de cobalto que es insoluble y de color negro, demostrándose así la existencia mATPasa por parte de las fibras musculares (Dubowitz y Brooke, 1973).

Si previamente a la incubación con ATP a pH 9.45 las preparaciones son introducidas en medios más alcalinos (pH 10.2-10.6) o ácidos (pH 4.6–4.3), conseguiremos evidenciar un mayor número de tipos fibrilares, como

consecuencia de la diferente labilidad que manifiestan los distintos tipos de isomiosina. Las fibras musculares así teñidas nos permiten la coloración adquirida por las miofibrillas a microscopía óptica, que quedan separadas entre sí por el espacio intermiofibrilar no teñido. Si el corte de la fibra fuera longitudinal, observaríamos que la tinción se aprecia sobre las bandas A, debido a que esta zona se encuentra ocupada por miosina, y es por lo que estas técnicas se denominan ATPasa miosínica (Dubowitz, 1985).

Las técnicas utilizadas en nuestro estudio corresponden a la referida por Snow, et al (1982) para preincubaciones alcalinas, y Dubowitz y Brooke (1973) para preincubaciones ácidas, introduciendo ciertas modificaciones, por lo que las describimos a continuación.

- ATPasa miosínica preincubación alcalina (método Snow, 1982)

1. Preincubación durante 15 minutos en la solución:

i. Cl_2Ca 0,1M

ii. Acetato sódico 0,07M

iii. Barbital sódico 0,075M

iv. Ph: 10.2, 10.3, 10.4, 10.5 (ajustados con NaOH 1M y 0,1M).

2. Lavado con agua destilada durante 5 minutos
3. Incubación durante 30 minutos en la solución:
 - i. Cl_2Ca 0,1M
 - ii. Acetato de sodio 0,7M
 - iii. Barbital sódico 0,075M
 - iv. ATP 1,5 mg/ml
 - v. PH: 9.45 (ajustado con NaOH 1M y 0,1M)
4. Lavado con cloruro de calcio 0,2M: dos baños de 5 minutos.
5. Lavado con cloruro de cobalto al 2% durante 5 minutos.
6. Lavado con agua destilada minuciosamente: dos baños.
7. Lavado con sulfuro de amonio al 1%, 1 minuto.
8. Lavado de 2 a 5 minutos con agua destilada.
9. Deshidratación en cadena ascendente de alcoholes con medio sintético (Eukitt).

- ATPasa miosínica preincubación ácida (método modificado de Dubowitz y Brooke, 1973)

En esta técnica la concentración del acetato de sodio es muy baja, y la solución preincubadora incorpora cloruro sódico.

1. Preincubar en la solución:

- a. 50 ml de solución A
- b. 101,5 ml de solución B
- c. 20 ml de cloruro de sodio (8,5%)
- d. Completar con agua destilada hasta 250 ml

Solución A: Acetato de sodio 1,94 gr, Barbital sódico 2,94gr, agua destilada.

Solución B: ClH 0,1 N

- e. PH: 4.3, 4.5, 4.6 (ajustados con NaOH 0,1M)

2. Lavar en solución de barbital sódico 0,1M y cloruro de calcio 0,18M en agua destilada. PH 9.4 (ajustado con CLH 0,1 N). Durante 30 segundos.

3. Incubar en la siguiente solución: solución lavadora con 15 mg de ATP. PH 9.4 (ajustado con NaOH 1M y 0,1M). Durante 45 minutos.
4. Cloruro de calcio al 1%: dos baños de 5 minutos.
5. Cloruro de cobalto al 2%: un baño de 5 minutos.
6. Barbital sódico 0,01M: un baño de 5-10 minutos.
7. Agua destilada: un baño de 30 segundos.
8. Sulfuro de amonio al 1%: un baño de 60 segundos.
9. Lavar con agua destilada: un baño de 2 a 5 minutos.
10. Deshidratar en cadena ascendente de alcoholes y montar en medio sintético.

▪ **Técnicas para determinación del metabolismo de las fibras.**

Nicotinamide Adenine Dinucleotide (Reduced)-Tetrazolium
Reductase (NADH-TR). Método Dubowitz y Brooke (1973)

Las enzimas oxidativas, entre las que se incluyen deshidrogenasas (SDH), diaforasas y oxidasas (NADH-TR), tienen importancia porque reflejan la utilización de diferentes intermediarios metabólicos del ciclo de Krebs y vías relacionadas indicando las posibles fuentes de energía en el metabolismo muscular.

Estas técnicas tienen su fundamento en el uso de una sal de tetrazolio insoluble que intercepta electrones en algún punto de la cadena respiratoria, quedando reducida, coloreada y precipitada por su carácter de insolubilidad.

En la empleada por nosotros (diaforasas), la NADH se utiliza como sustrato y uno de los compuestos del tetrazolium (NBT) como captador de electrones. Con esta técnica se manifiesta claramente el espacio intermiofibrilar que incluye mitocondrias y retículo sarcoplásmico, ya que las miofibrillas no se tiñen (Dubowitz, 1985).

Metodología a seguir:

1. Incubar en la siguiente solución: 0,2 M Tris Buffer (ph 7,4)—10ml, NBT—10ml, NADH—8ml. Ph 7,2 (ajustar con ácido acético puro 1M).Tiempo de incubación de 30-60 minutos a 37o C.

2. Lavado con agua destilada: 1 minuto.
3. Deshidratación en cadena de acetonas.
4. Lavado en agua destilada: 1 minuto.
5. Montaje en glicerina y sellado con parafina o esmalte.

Las técnicas histoquímicas que hemos referido nos permitirán clasificar a las fibras según la actividad que presenta la enzima ATPasa miosínica frente a preincubaciones en medios alcalinos y ácidos, actividad mATPasa y en base al potencial oxidativo que exhiben actividad NADH-TR. Siguiendo los criterios establecidos previamente por Snow et al. (1982), Latorre (1990) y Latorre et al. (1993).

4.8. Estudio morfométrico.

- **Evaluación cuantitativa de las fibras**

Los porcentajes fibrilares los obtuvimos tras el recuento de entre 500 y 1000 fibras de campos superficiales y profundos elegidos al azar (Latorre, 1990), incluidas en fascículos completos, empleando las secuencias fotográficas que reconstruyen la sección completa de los

diferentes músculos, utilizando preparaciones teñidas con la técnica de mATPasa, y a preincubaciones que nos permitían distinguir todos los tipos de fibras presentes.

Los valores correspondientes a porcentajes se exportaron al programa HARVARD GRAPHICS 2.0 para Windows con el fin de obtener los diferentes diagramas de sectores.

Los estudios realizados al microscopio electrónico, han sido fundamentalmente descriptivo por lo que no se le ha realizado ningún estudio estadístico.

- **Microfotografiado.**

Se realizó con la mayor celeridad posible ya que la intensidad y calidad de las reacciones enzimáticas e inmunohistoquímicas disminuyen con el tiempo. Utilizamos un microscopio Leitz Dialux 20 con equipo fotográfico automático incorporado. Las preparaciones fueron fotografiadas a 4x, 10x, 20x, 40x, utilizando películas en color y blanco y negro.

Las fotografías a 4x y 10x fueron empleadas para realizar una reconstrucción lo más completa posible de las secciones fibrilares

obtenidas. Las fotografías a mayores aumentos nos permiten obtener imágenes de un mismo campo histológico sometido a las distintas técnicas, con el fin de analizar el comportamiento de un mismo grupo de fibras y proceder a su identificación y catalogación.

▪ Estimaciones estereológicas generales

Para realizar los estudios morfométricos hemos remarcado los contornos de las diferentes fibras musculares, como se indica en la imagen que se presenta (fig. 15)

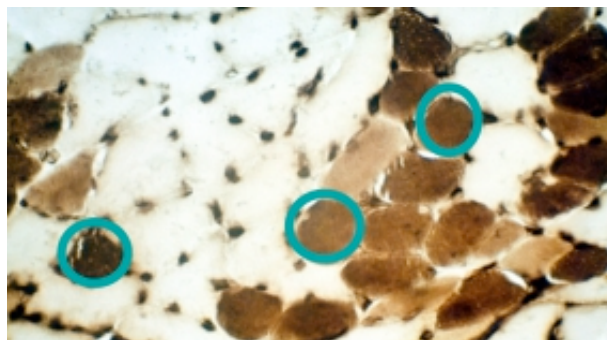


Figura 15. Dibujo de contornos sobre corte histológico.

$$\text{est QA(fibl/tis)} = \Sigma Q\text{fibl} / (\Sigma P(\text{tis}) \cdot a/p)$$

- **Estimación de la densidad numérica.**

Se estimó la densidad numérica de las fibras de colágeno tipo I y tipo III, en un corte transversal y longitudinal, en un plano superponiendo un sistema de test constituido por cuatro áreas de contaje sobre las imágenes microscópicas (fig. 16).

De este modo el número de perfiles fibrilares por unidad de área fue calculado de acuerdo con la fórmula siguiente (Gundersen et al. 1988):

$$\text{est QA(fibl/tis)} = \Sigma Q(\text{fibl}) / (\Sigma P(\text{tis}) \cdot a/p)$$

Donde QA(nucl/tis) es la densidad numérica de las fibras por unidad de área del tejido, $\Sigma Q(\text{fib})$ es el número total de perfiles fibrilares contados dentro de las áreas de contaje; $\Sigma P(\text{tis})$ es el número de puntos que cayeron en el tejido; a/p es el área asociada con un punto del sistema test (en nuestro estudio, $a/p = 125 \mu\text{m}^2$).

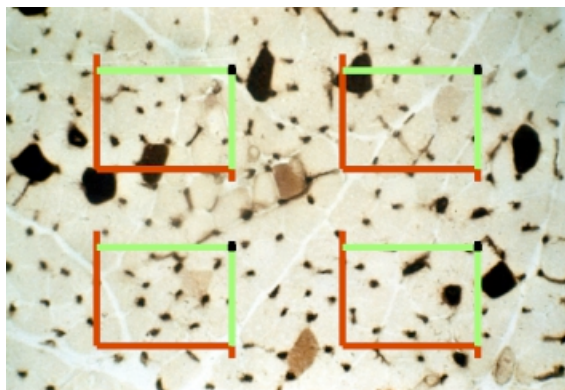


Figura 16 .Imagen con escalas de sistema test, superpuestas sobre cortes histológicos.

- **Estimación del volumen fibrilar medio**

La información tridimensional sobre el volumen fibrilar se obtuvo según el método propuesto por Gundersen and Jensen (1985) aplicando un sistema test compuesto de puntos asociados a líneas paralelas que se superpuso a las imágenes microscópicas. Las fibras a los que se superponen los puntos de sistema test son los que se consideran en la estimación del volumen; esta estimación resulta proporcional al propio volumen de las fibras, dado que cuanto mayor es éste mayor es la probabilidad de ser tenido en cuenta en el muestreo.

La longitud de línea (l_o) interceptada por los núcleos incluidos en el muestreo se midió usando el cursor del sistema de análisis de imagen. La estimación del volumen fibrilar medio (fibras vv) se obtuvo del cálculo siguiente:

$$\text{fibras } vv = l_o \cdot \pi/3.$$

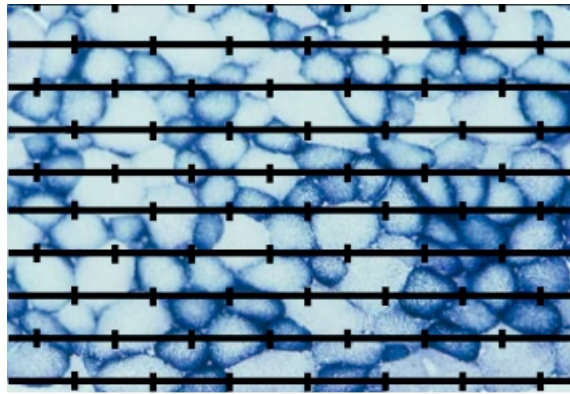


Figura 17. Imagen de un corte muscular en la que se han superpuesto una plantilla de líneas test usada para la estimación de volumen nuclear medio.

- **Estimación de la fracción de volumen y densidad de superficie.**

Estos parámetros se obtuvieron usando un sistema test compuesto de cruces regularmente espaciados el cual se superpuso a las correspondientes imágenes microscópicas.

El cálculo es:

$$\text{est } VV(\text{fib}/\text{tis}) = \Sigma P(\text{fibras}) / \Sigma P(\text{tis})$$

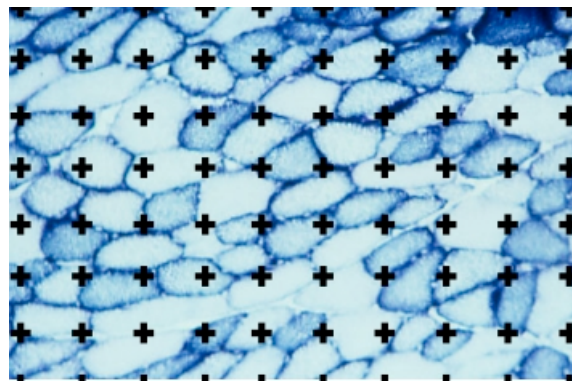


Figura 18. Imagen de un corte muscular en la que se han superpuesto una plantilla con cruces test usada en la estimación de la fracción de volumen y densidad de superficie.

4.9. Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico Statgraphic (Centurión XVI®), a través de diferentes pruebas estadísticas y gráficas. Para ver si existían diferencias significativas entre las medias se usó la prueba- F en la tabla ANOVA. Las Pruebas de Múltiples Rangos se utilizaron para comprobar si las medias son significativamente diferentes unas de otras, usando el método de LSD de Fisher para discriminar entre las medias. Los resultados se expresan como media \pm desviación típica y un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

5. Resultados

5. Resultados

En el presente capítulos estudiaremos las alteraciones que se producen en el musculo esquelético por el uso de disruptores endocrinos, como el BPA, y su posterior recuperación tras la retirada y con tratamientos de cultivos de monocitos medulares.

5.1. Grupo Control

- **Estudio estructural y ultraestructural**

Los estudios realizados en este grupo control, no existen cuadros lesionales de importancia, solo los debido a los tratamientos traumáticos. Y se

evidenció una íntima relación entre las fibras musculares y el endomisio, perimisio y epimisio, todas estas envueltas son relativamente delgadas estructurándose como un músculo de valor cárnico. La fibra muscular es una célula multinucleada, disponiéndose dichos núcleos en posición periférica, y su material contráctil se distribuyó longitudinalmente en las denominadas miofibrillas, con las estrías transversales muy evidentes, sobre todo las bandas A e I. Con la técnica del tricrómico se detectó la relación de las fibras musculares con la fibra de colágeno del endomisio. Sin embargo, se observaron determinadas zonas musculares donde dicha actividad apareció acentuada o disminuida

Al **microscopio óptico**, la fibra muscular en corte longitudinal muestra bandas alternas oscuras (A) y claras. Con luz polarizada, las bandas A son birrefringentes o anisotrópicas, y se ven brillantes; las bandas I aparecen oscuras y son isotrópicas, de aquí el nombre de las bandas. Cada banda A muestra una zona central menos birrefringente llamada banda H, y cada banda I está dividida por una línea o banda Z bien definida.

Aunque las bandas parecen cruzar por completo la fibra muscular, en una buena preparación se puede ver que están limitadas a las miofibrillas y que no se ven en el sarcoplasma.

El segmento entre dos líneas Z adyacentes se denomina sarcómera, de unas 2 a 3 μm de longitud, de las cuales 1.5 μm corresponden a la banda A y 0.8 a la banda I. La sarcómera no sólo es una unidad estructural, sino también la unidad contráctil básica. En el músculo relajado en corte longitudinal las bandas están bien marcadas. Durante la contracción, las miofibrillas son más gruesas y las sarcómeras más cortas, ya que la distancia entre las líneas Z se acorta en forma progresiva. A medida que las bandas I se hacen más cortas, los extremos de las bandas A se aproximan a las líneas Z, hasta que al final, en contracción total, las bandas A e I son indistinguibles; pero la longitud de la banda A en la contracción permanece constante. Estas bandas no son visibles en el corte transversal de una fibra muscular estriada.

Las miofibrillas, que aparecen como filamentos largos y paralelos, están formadas por unidades más pequeñas llamadas miofilamentos. Hay dos tipos principales de ellos según sus calibres (gruesos y delgados) y su composición química. Los dos tipos están dispuestos de manera regular, y las bandas transversales que se ven al microscopio óptico sólo son un reflejo de su distribución en la sarcómera. Los filamentos gruesos contienen principalmente miosina, y se encuentran en el centro de la sarcómera ocupando la banda A. Los filamentos delgados contienen actina, y se extienden de cada lado de la banda Z y pasan a través de la banda I adyacente y parte de la banda A, donde se interdigitan con los filamentos gruesos, por lo que en corte

transversal de la banda A, cada filamento grueso está rodeado por seis de los delgados en disposición hexagonal. La banda H sólo es la zona central de la banda A y está libre de filamentos delgados, y su anchura está determinada por el grado de contracción. Así, el diseño de las bandas se explica por la presencia o ausencia de superposición entre los dos tipos de filamentos. Por tanto, en corte transversal la banda 1 sólo contiene filamentos delgados y las extremidades de la banda A contienen gruesos y delgados. En la banda H sólo hay filamentos gruesos. En la línea M al centro de ella, los filamentos gruesos están interconectados por filamentos finos dispuestos en forma radial, de manera que cada uno está conectado en el plano transversal con los seis filamentos adyacentes. Es probable que estos filamentos transversales de la línea M ayuden a mantener la disposición y el espaciamiento regulares de los filamentos gruesos en la sarcómera.

En las regiones de superposición (esto es, en las extremidades de la banda A), cada filamento grueso de miosina está rodeado por seis filamentos delgados de actina. El filamento grueso muestra estructuras a manera de puentes que se extienden en forma radial hacia los filamentos delgados. Estos puentes faltan en el centro de la banda H.

Un filamento grueso está formado por un haz de moléculas de miosina, cada una en forma de palo de golf con un tallo y una cabeza. La molécula de miosina tiene dos subunidades, la tneromiosina ligera, que forma la mayor parte del tallo, y la meromiosina pesada, que forma el resto del tallo y la cabeza. Son las cabezas de las moléculas las que sobresalen del haz para extenderse como puentes transversales entre los filamentos gruesos y los delgados.

Las cabezas se disponen en espiral alrededor del filamento grueso, de manera que se forman seis hileras longitudinales que conectan con los seis filamentos delgados relacionados y el filamento grueso está polarizado, ya que as cabezas están dirigidas alejándose de su parte media (en la línea M). En la parte central del haz sólo se observan os tallos de las moléculas. La cabeza de la molécula de miosina es flexible en el tallo, y las cabezas o puentes son los que poseen actividad de adenosintrifosfatasa (ATPasa) necesaria para la interacción de la actina y la miosina durante la contracción. Un filamento delgado está formado principalmente por F-actina, una proteína filamentosa compuesta de dos hilos de subunidades globulares de G-actina, hilos que están enrollados de manera helicoidal. La F-aetina tiene polaridad lineal; todos los filamentos que se insertan en un lado de la línea Z son de la misma polaridad, y los que se insertan ene1 otro lado de la línea Z (y en el otro extremo de la misma sarcómera) son de polaridad opuesta. En los filamentos

delgados también hay tropomiosina y troponina. Las moléculas de tropomiosina son largas y delgadas y se encuentran de un extremo a otro en los surcos de la doble hélice de F-actina; las moléculas de troponina globular están unidas a la tropomiosina a intervalos regulares.

En la línea Z, los filamentos delgados de sarcómeras adyacentes no están en registro; esto da un aspecto característico de zigzag a la línea Z.

Parece que cada filamento delgado de una sarcómera está unido por filamentos muy finos a cuatro filamentos delgados de la sarcómera adyacente; estos filamentos finos forman un diseño tetragonal en el corte transversal. Los componentes químicos de la línea Z incluyen actina, tropomiosina y alfa-actinina, pero su composición estructural aún no es muy clara.

En las células musculares hay otros filamentos aparte de los miofilamentos delgados y gruesos. Los filamentos intermedios forman una red extensa. En un plano transversal, hay fascículos de filamentos transversales cortos que conectan miofibrillas adyacentes, pasando entre sus líneas Z y M. En un plano longitudinal, hay filamentos continuos, largos y paralelos, que conectan la periferia de líneas Z sucesivas para formar una vaina a la sarcómera. Se cree que estos filamentos desempeñan un papel importante como citoesqueleto en la estructura y la mecánica de la fibra muscular.

El sarcolema, demasiado delgado para ser observado con claridad con el microscopio óptico, consta de la membrana plasmática de la célula muscular cubierta por una lámina basal extracelular fina con algunas microfibrillas de colágena relacionadas con ellas. Entre las fibras musculares también se encuentran bandas delgadas de tejido elástico.

El retículo sarcoplásmico representa un tipo especial de retículo endoplásmico agranular (liso). Es extenso y comprende un sistema continuo de túbulos y cisternas limitados por membrana que forman una vaina o collar alrededor de cada miofibrilla, con comunicaciones entre los collares de sarcómeras adyacentes de miofibrillas vecinas. En el músculo de los mamíferos, la vaina está formada principalmente por elementos tubulares en disposición longitudinal alrededor de la banda A, con comunicaciones transversales que son notables en la región de la banda H. En las uniones A-I hacia los extremos de las sarcómeras, los túbulos están unidos a las cisternas, llamadas cisternas terminales, que tienen forma de anillos alrededor de las miofibrillas en las uniones A-I. Una red semejante de túbulos rodea las bandas I, con otra cisterna terminal en cada unión A-I, pero están separados por un túbulo transversal más delgado llamado túbulo T. Esta disposición de dos cisternas terminales del retículo sarcoplásmico y un túbulo T central se llama tríada, y hay dos tríadas por cada sarcómera en el músculo. Los túbulos transversales (T) son invaginaciones del sarcolema superficial, y su luz se

continúa con el espacio extracelular. Estos pasan del sarcolema al interior de la fibra muscular a intervalos regulares, se ramifican y, como ya se señaló, se encuentran entre las cisternas terminales del retículo sarcoplásmico para formar las tríadas en las uniones A-I. En las tríadas, las membranas de los túbulos T y del retículo sarcoplásmico forman uniones o acoplamientos. Otras características del sarcoplasma que se ven por microscopia electrónica incluyen la presencia de numerosos sarcosomas o mitocondrias. Estas por lo general son grandes, con crestas agrupadas muy juntas, y se encuentran subyacentes al sarcolema, concentradas en los polos nucleares y en hileras paralelas dispuestas de manera regular entre las miofibrillas. El sarcoplasma paranuclear suele contener un pequeño aparato de Golgi, algunos ribosomas y unos cuantos elementos del retículo endoplásmico granular. También se pueden observar algunos lisosomas y numerosas partículas de glucógenos dispersas por toda la célula, pero a menudo concentrado entre las miofibrillas a nivel de las bandas I.

El tejido conectivo relacionado con las fibras musculares tiene tres grados de grosor:

Todo el músculo está envuelto por una capa consistente de tejido conectivo, el epimisio.

Las divisiones más delgadas de tejido conectivo que rodean a los haces o fascículos de fibras musculares forman el perimisio.

Hay tejido conectivo aún más delgado que se extiende a partir del perimisio para penetrar entre las fibras y rodearlas como endomisio. Este consta de una red de fibras reticulares y algunas células de tejido conectivo, y una cantidad variable de fibras elásticas. En el endomisio se encuentran capilares sanguíneos y nervios pequeños. La cantidad total de tejido fibroconectivo. Las fibras musculares individuales son cónicas en sus extremos y entran en las vainas de sarcolema como los dedos en un guante. Además, el sarcolema muestra surcos o invaginaciones hacia las cuales se extiende el endomisio para fijarse firmemente en ellas. En las extremidades de cada fibra muscular, las miofibrillas están unidas al sarcolema.

El tejido conjuntivo laxo está ampliamente distribuido, pudiendo considerarse como el tipo general del tejido conjuntivo en el que pueden encontrarse todos los componentes extracelulares y los tipos celulares descritos. Las células mesenquimatosas del tejido conjuntivo laxo. La matriz extracelular está conformada por fibras (reticulares, elásticas y colágeno) cuya abundancia y orientación depende de la localización y función específica. Las células y las fibras se encuentran ampliamente separadas por espacios ocupados por sustancia fundamental que le da las características de

elasticidad, blandura e hidratación al tejido conjuntivo laxo. Estas oquedades, antiguamente llamadas Sistema Lacunar de Aschorf, están ocupadas por la matriz extracelular y que son capaces de distenderse para albergar grandes cantidades de líquido. Debido a estas oquedades es por lo que a este tejido se le denomina de tejido areolar.

El tejido conjuntivo laxo, constituye la lámina propia y proporcionando el soporte vascular. Este tejido cuando conforma la lámina propia de las membranas mucosas, toma una vital importancia en los fenómenos inflamatorios y reacciones alérgicas. Del mismo modo cuando integra el intersticio del tejido pulmonar. Y todo ello se debe a sus componentes celulares. Además en estas localizaciones, ejerce un papel puramente físico permitiendo la elasticidad de órganos huecos y a la hipodermis. También está presente en el estroma de la mayoría de los órganos y las serosas.

El músculo estriado dispone de un riego sanguíneo muy rico. Las arterias provienen del epimisio y siguiendo el perimisio penetran en la sustancia del músculo. Las arterias se ramifican en arteriolas y terminan en capilares, que siguen por las finas trabéculas del endomisio. La mayor parte de capilares se hayan dispuestos paralelamente a las fibras musculares, pero es frecuente que desprendan ramas en ángulo recto.

Casi todos los linfáticos del músculo estriado se hayan en su estructura conectivas mas gruesas. En este punto difieren del músculo cardiaco, que tiene linfáticos y capilares entre las fibras.

Los vasos linfáticos que drenan el líquido tisular son muy numerosos, pero no se encuentran en relación íntima con las fibras. Se encuentran en el epimisio y el perimisio, pero no en el endomisio.

Los nervios penetran en los músculos siguiendo el tejido conectivo de estos últimos. El número de fibras musculares inervadas por una sola fibra nerviosa es muy variable. En uno de los músculos extrínsecos del ojo, donde se requiere una extraordinaria presión en los movimientos, hay una fibra nerviosa para cada fibra muscular. El extremo opuesto esta representado por los músculos que no han de efectuar movimientos delicados, en los cuales una sola fibra nerviosa puede ramificarse e inervar más de un centenar de fibras musculares. Una fibra nerviosa y las fibras musculares por ella inervadas reciben en conjunto el nombre de unidad motora. Si una sola fibra inerva varias fibras musculares de un músculo, estas no constituyen un grupo localizado como pudiera pensarse; por lo contrario, las fibras musculares inervadas por una sola fibra nerviosa puede estar distribuidas muy difusamente por todo el músculo.

▪ Estudio histoenzimológicas

Con la técnica de HE, tenemos graves problemas al hacer estudios comparativos de las fibras musculares y el colágeno del endomisio, al teñirse ambas de rosa. Por ese motivo para los estudios generales y sobre todo los morfométricos, es preferible utilizar el TM, ya que la fibra muscular se tiñe de rojo intenso y el colágeno de azul.

Con la técnica del TM, se aprecia en la fibra muscular numerosos núcleos al su material contráctil se distribuye longitudinalmente en las denominadas ser una célula multinucleada, disponiéndose dichos núcleos en posición periférica y miofibrillas, con las estrías transversales muy evidentes, sobre todo las bandas A e I en los sarcomeros.

Con esta técnica se favorece el estudio de las fibras de colágeno del endomisio, junto a la red de capilares.

Con las técnicas histoenzimológicas oxidativas, en ambos músculos se aprecia que su distribución es uniforme, si bien se acentúan estas fibras en las zonas periféricas de los músculos. Y se detecta fibras que dan intensamente la reacción denominándose de alta actividad oxidativa, fibras del tipo I, las de mediana actividad oxidativa, fibras del tipo IIa y escasa actividad oxidativa, fibras del tipo IIb.

Una vez analizados los resultados de las diferentes técnicas histoenzimológicas, se resalta la distribución de las diferentes fibras que hacen que los músculos del cerdo tengan una estructuración especial que la diferencian del resto de las especies domésticas. En esta distribución especial las fibras se disponen a modo de un mosaico en donde las fibras tipo I se asocian en un número reducido, de dos a cuatro y se disponen en el centro de una de las piezas del mosaico, en tanto que las fibras tipo IIa que son más abundantes rodean de forma homogénea a las fibras anteriores, y todo ello esta finalmente envuelto por las fibras tipo IIb que son muy numerosas y de gran tamaño.

- **Estudio morfométrico**

En los estudios morfométricos realizados en este músculo el porcentaje de sus fibras son las siguientes:

longissimus dorsi; Tipo I: 10,17 % ($\pm 1,48$).; tipo IIa: 43,14 % ($\pm 3,08$).; tipo IIb 45,69 % ($\pm 4,23$).

longissimus lumbaris; Tipo I: 10,41 % ($\pm 1,44$); tipo IIa: 41,81% ($\pm 2,63$); tipo IIb: 46,03 % ($\pm 4,81$).

Con la técnica TM la morfometría del músculo longissimus dorsi:

Volumen: 426,97 μm^3 ($\pm 40,90$); diámetro máximo: 15,34 μm ($\pm 0,41$); diámetro mínimo: 7,13 μm ($\pm 0,31$); diámetro medio: 8,21 μm ($\pm 0,25$); perímetro 27,45 μm ($\pm 2,87$); FF: 0.87 (± 0.05).

Y del longissimus lumbaris corresponden a:

Volumen: 421,21 μm^3 ($\pm 22,34$); diámetro máximo: 11,52 μm ($\pm 2,92$); diámetro mínimo: 5,89 μm ($\pm 0,78$); diámetro medio: 6,74 μm ($\pm 0,59$); perímetro 27,23 μm ($\pm 4,34$); FF: 0.86 (± 0.007).

5.2. Grupo BPA

- **Estudio estructural y ultraestructural**

En los estudios morfológicos tanto con el microscopio óptico y electrónico, Hemos encontrados en las fibras musculares y colágenas del endomisio, graves modificaciones en ambos músculos, *longissimus dorsi* y *longissimus lumbaris*, con patrones muy similares.

Hemos observado en primer lugar, un pleomorfismo fibrilar muy marcado, con una disminución evidente del tejido graso y tejido conectivo endomisial. Dentro del pleomorfismo marcado destacó una evidente hipertrofia fibrilar, existiendo también algunas fibras de tamaño más pequeño. La hipertrofia fibrilar se acompañó de modificaciones de sus componentes. En primer lugar, existieron alteraciones del núcleo, si bien las fibras musculares son multinucleadas y de disposición periférica, gran cantidad de sus componentes se “centralizaron”, es decir, perdieron su localización y se dispusieron hacia el centro del sarcoplasma. Sin duda alguna la alteración principal que produjo el BPA en las fibras musculares fue una hipertrofia celular, que tanto en cortes transversales como longitudinales mostraron un aumento muy marcado del sarcoplasma y las miofibrillas

Los estudios morfológicos usuales de las fibras musculares al microscopio óptico y con la técnica de hematoxilina-eosina, presentan modificaciones bastante significativas, que como son muy similares en ambos músculos estudiados las describiremos conjuntamente.

En primer hemos encontrado un pleomorfismo fibrilar muy marcado, y una disminución evidente del tejido graso, como corresponde a los tratamiento con BPA, e igualmente a la pérdida de tejido conectivo endomisial. Dentro del pleomorfismo marcado se destaca una hipertrofia fibrilar destacada, existiendo

también algunas fibras de tamaño más pequeño, destacándose la pérdida del factor de forma, que indica la pérdida de la esfericidad de las fibras de este grupo comparativamente con el grupo control.

La hipertrofia fibrilar esta acompañada por modificaciones de sus componentes. En primer lugar existen alteraciones del núcleo, si bien las fibras musculares son multinucleadas y de disposición periférica, en los tratamientos con el BPA aumenta sensiblemente el numero de sus núcleos y además gran cantidad de estos componentes se “centralizan”, es decir pierden su localización y se disponen hacia el centro del sarcoplasma. Sin duda alguna la alteración que produce los disruptores en las fibras musculares es una hipertrofia celular, que tanto en cortes transversales como longitudinales muestran un aumento muy marcado del sarcoplasma y las miofibrillas. En los cortes usuales el material contráctil a la vez que se aumenta en número pierde su distribución longitudinal, alterándose gravemente el material contráctil debido a una pérdida de la relación del contenido-continente. Dentro de estas alteraciones en primer lugar se detecta un aumento desmesurado de las miofibrillas pero mantiene su disposición inicial, en cambio en gran número de casos este aumento miofibrilar al no ir acompañado de distensiones del sarcolema, cambia la distribución de las miofibrillas, disponiéndose las bandas del material contráctil a modo de estratos concéntricos, denominándose degeneración en “huella dactilar”. Dentro de la hipertrofia fibrilar se desarrollan

unos canales internos a los que se les adosan los núcleos, denominándose “canalización de las fibras”. Como indicamos en ambos músculos se producen dichas alteraciones.

En los estudios realizados con el microscopio electrónico, en ambos músculos presentan las mismas modificaciones, por lo que las estudiaremos conjuntamente. La alteración que define la acción del BPA sobre las fibras musculares estriadas es la hipertrofia celular, modificación que hemos encontrado como lesión principal en nuestra experiencia. La hipertrofia que hemos analizado consiste en un aumento general de todos los componentes de las fibras musculares. Con relación a los núcleos, debido al escaso grosor de los cortes, normalmente sólo se pueden detectar pocos de ellos, por lo que en esta microscopía no se puede describir el aumento en el número de los núcleos, pero en cambio sí se ha podido comprobar la centralización de los mismos, imagen que es muy frecuente.

Dentro de la hipertrofia muscular los componentes que más destacan son las miofibrillas. La hipertrofia de estas fibras se debe fundamentalmente a un aumento de los componentes contráctiles. Son numerosísimas las miofibrillas que se presentan, con dos posibilidades: en primer lugar se mantiene el ordenamiento de las estrías transversales, con las bandas “A” e “I” coordinadas; y en segundo lugar se desorganizan entre sí las diferentes

miofibrillas, por lo que las diferentes bandas transversales no guardan el paralelismo normal. Debido al aumento de los componentes contráctiles se desequilibra la relación entre el contingente y el contenido por lo que existen repliegues de las miofibrillas. Estas alteraciones pueden ser: unifibrilar, en la que de forma periférica una miofibrilla, perfectamente organizada, se dispone a modo de anillo envolvente con un cambio en el sentido de la contracción, denominada “degeneración en anillo”, y también multifibrilar, que cambiando en su totalidad el sentido de su disposición y distribuyéndose a modo de estratos concéntricos, denominada “degeneración en huella dactilar”.

Acompañando el aumento de las miofibrillas existe un aumento manifiesto de mitocondrias, aunque se modifica su distribución. Las mitocondrias pierden su relación con las estrías de las miofibrillas y se disponen en grandes acumulos. Otros componentes que se alteran son el retículo sarcoplásmico y los túbulos “T”, aunque mantienen la relación entre estos elementos para formar las “triadas” que se localizan de forma imprecisa entre las diferentes bandas.

- **Estudio histoenzimológico**

Los estudios histoenzimológicos realizados en este grupo se han obtenido con las mismas técnicas que en el grupo control. Las fibras tratadas

en secciones transversales, con las técnicas mATPasa y en preincubaciones alcalinas son las siguientes fibras:

- Fibras de tinción intensa, oscura, actividad mATPasa alcalino-estable.
- Fibras de tinción moderada o intermedia, actividad mATPasa alcalino-estable.
- Fibras de tinción clara, actividad mATPasa alcalino-lábil.
- Fibras alteradas de tinción inespecífica. En las preincubaciones ácidas realizadas a pH 4.6, también se apreciaron distintos tipos de fibras:
 - Fibras de tinción intensa, oscura, actividad mATPasa ácido-estable.
 - Fibras de tinción moderada o intermedia, actividad mATPasa ácido- estable.
 - Fibras de tinción clara, actividad mATPasa ácido-lábil.
- Fibras alteradas de tinción inespecífica. Al aplicar las preincubaciones ácidas a pH 4.3 sólo se han identificado dos tipos de fibras, debido a que no se detecta las fibras con tinción moderada.
- Fibras de tinción intensa, oscura, actividad ácido-estable.
- Fibras de tinción clara, actividad mATPasa ácido-lábil.
- Fibras alteradas de tinción inespecífica. Con la técnica NADH-TR hemos apreciado distintas fibras con relación a su capacidad oxidativa:
 - Fibras teñidas intensamente, alta actividad oxidativa.

- Fibras de tinción moderada o intermedia, moderada capacidad oxidativa.
- Fibras con baja tinción, escasa actividad oxidativa.
- Fibras alteradas, son las que tienen una tinción irregular y no se pueden clasificar como las anteriores. También se resalta la distribución de las fibras en los músculos del cerdo, con las técnicas histoenzimológicas en este grupo. En esta disposición especial las fibras mantienen el mosaico celular, donde las fibras tipo I ocupan el centro de los diferentes componentes en un número reducido, de dos a cuatro fibras, en tanto que las fibras tipo IIa que son más abundantes rodean de forma homogénea a las fibras anteriores, y todo ello está finalmente envuelto por las fibras tipo IIb, y lo que diferencia esta distribución con el grupo control es la presencia de las fibras alteradas que en ningún momento tienen una distribución concreta, todo lo contrario, se disponen en agrupaciones más o menos numerosas por todo el mosaico fibrilar.

▪ Estudio morfométrico

En los estudios morfométricos, mediante las técnicas de la mATPasa, hemos encontrado los siguientes valores porcentuales en el músculo *longissimus dorsi*:

Tipo I: 11,96 % ($\pm 2,17$); tipo IIa: 41,06 % ($\pm 2,66$); tipo IIb: 42,06 % ($\pm 2,78$); fibras alteradas: 15,68 % ($\pm 0,03$).

longissimus lumbaris:

Tipo I: 12,10 % ($\pm 1,47$); tipo IIa: 40,23 % ($\pm 2,06$); tipo IIb: 42,89 % ($\pm 3,62$); fibras alteradas: 17,82 %.

Y con la técnica del TM hemos obtenido las siguientes medidas.

Músculo *longissimus dorsi*:

Volumen: 535,31 μm^3 ($\pm 22,05$); **diámetro máximo:** 22,08 μm ($\pm 5,66$); **diámetro mínimo:** 9,23 μm ($\pm 0,36$); **diámetro medio:** 11,69 μm ($\pm 0,25$); **perímetro** 45,32 μm ($\pm 4,22$); **FF:** 0.78 (± 0.003).

Músculo *longissimus lumbaris*:

Volumen: 545,02 μm^3 ($\pm 30,39$); **diámetro máximo:** 17,51 μm ($\pm 1,91$); **diámetro mínimo:** 8,45 μm ($\pm 0,39$); **diámetro medio:** 14,65 μm ($\pm 0,23$); **perímetro** 41,64 μm ($\pm 4,65$); **FF:** 0.78 ($\pm 0,06$).

5.3. Grupo retirada BPA

- **Estudio estructural y ultraestructural**

En el presente grupo se va a exponer la estructura que tiene un músculo y la composición de las diferentes partes del mismo, desde la unidad mínima contráctil (actina y miosina) hasta la capa más externa que recubre al músculo (epimisio).

En esta fibra muscular encontramos en su sarcoplasma que hay una gran cantidad de miofibrillas (que ocupan la mayor parte de esa célula). Las miofibrillas están constituidas por los filamentos; que a su vez, están constituidos por proteínas que están unidas de una forma peculiar; hay distintos tipos de filamentos.

En la célula muscular tenemos también los túbulos T, que son unas estructuras específicas de la célula muscular. Los túbulos T en realidad se llaman túbulos transversales o también invaginaciones del sarcolema. Estos túbulos transversales están dispuestos de tal forma que conectan el exterior de la célula muscular con el interior. La función de estos túbulos T van a permitir

que el potencial de acción (el cual se genera el soma de la motoneurona, situado en la médula espinal) alcance la célula muscular.

El músculo además de estar constituido por tejido muscular, está constituido por otros tejidos que son fundamentales para que pueda realizar su actividad.

Encontramos tejido conectivo, el encargado de dar al músculo sus propiedades elásticas.

Encontramos tejido nervioso, que transmite la información hacia y desde el músculo.

Encontramos también tejido vascular, para que el oxígeno y los sustratos lleguen al músculo.

Por otro lado, el músculo esquelético presenta las 3 capas, que de profundo a superficial son: Endomisio: Capa de tejido conectivo que recubre a cada una de las fibras musculares y que las separa de las otras; Perimisio: Capa de tejido conectivo que envuelve a los paquetes de fibras musculares, a los fascículos musculares.; y Epimisio: Capa de tejido conectivo que envuelve a cada uno de los músculos.

La célula muscular puede tener varios núcleos, se dice que la célula muscular es polinucleada. La mayoría del sarcoplasma está ocupado por las miofibrillas y estas a su vez se constituyen de filamentos, que es lo más importante de todo esto. Los túbulos T se disponen perpendicularmente al eje longitudinal de la célula muscular.. Por tanto, de mayor a menor orden tendríamos en la célula muscular: Fibra muscular, , Miofibrilla, y Filamentos o miofilamentos.

La triada está constituida por los 2 túbulos T y la vesícula terminal del retículo sarcoplásmico (o cisterna terminal). El retículo sarcoplásmico está dispuesto en paralelo al eje longitudinal de la fibra.

Se destaca en la unidad funcional de la fibra muscular, porque en el sarcómero tenemos todos los elementos. La estructura fundamental del sarcómero observada es:

Líneas Z: Los límites del sarcómero vienen marcados por 2 líneas Z. Las líneas Z están dispuestas en perpendicular al eje longitudinal de la célula. Los filamentos de actina se encuentran anclados a las líneas Z, por tanto, estos filamentos están dispuestos a la línea Z y paralelos al eje longitudinal de la fibra muscular. En el centro del sarcómero no hay filamentos de actina. La línea Z sirve para anclar los filamentos de actina.

Línea M: Es una línea que hay justo en el centro del sarcómero y que es paralela a las líneas Z. En esta línea M están anclados los filamentos de miosina. Por tanto, los filamentos de miosina están dispuestos en paralelo a los filamentos de actina. Los filamentos de miosina solo ocupan la zona central del sarcómero porque no llegan a la línea Z. También son perpendiculares a la línea Z. La línea M sirve como anclaje a los filamentos de miosina.

Banda I: En las zonas claras de la célula muscular (vista al microscopio) solo hay filamentos de actina, por lo tanto, en los extremos del sarcómero tenemos una banda I a cada lado. En la banda I solo hay filamentos de actina, no hay miosina, porque la miosina solo ocupa el centro del sarcómero. Por tanto, la línea Z lo que hace es dividir la banda I en dos mitades.

Banda A: Es la zona oscura del músculo. Esta banda está en la zona central del sarcómero. En esta banda tenemos filamentos tanto de actina como de miosina, porque en determinadas zonas del sarcómero los filamentos de actina y de miosina se solapan.

Zona H: Es la parte de la banda A en la que solamente hay filamentos de miosina, por tanto, en esta zona H no hay filamentos de actina. Por tanto, la zona H ocupa justo el centro del sarcómero. Justo dentro de la zona H está la línea M. La zona H pertenece a la Banda A.

▪ Estudio histoenzimológico

Con la técnica para la detección de las enzimas mATPasa, en las preincubaciones alcalinas a pH 10.3, se nos ha permitido diferenciar tres tipos de fibras:

- Fibras de tinción intensa, oscura, actividad mATPasa alcalino-estable.
- Fibras de tinción moderada o intermedia, actividad mATPasa alcalino estable.
- Fibras de tinción clara, actividad mATPasa alcalino-lábil.
- Fibras alteradas o de reacción irregular. En las preincubaciones ácidas realizadas a pH 4.6, también se nos ha permitido reconocer tres tipos de fibras:
 - Fibras de tinción intensa, oscuras, actividad mATPasa ácido- estable.
 - Fibras de tinción moderada o intermedia, actividad mATPasa ácida-estable.
 - Fibras de tinción clara, actividad mATPasa ácido-lábil.
 - Fibras alteradas de tinción inespecífica.

Cuando aplicamos las preincubaciones ácidas a pH 4.3 sólo fue posible reconocer dos tipos de fibras, ya que las observadas anteriormente con tinción moderada pierden ahora su intensidad tintorial:

- Fibras de tinción intensa, oscura, actividad m ATPasa ácido-estable.
- Fibras de tinción clara, actividad mATPasa ácido-lábil.
- Fibras alteradas de tinción inespecífica. Con las técnicas de capacidad oxidativa de NADH-TR, identificamos tres tipos de fibras:
 - Fibras teñidas intensamente, alta actividad oxidativa.
 - Fibras teñidas tenuemente, moderada capacidad oxidativa.
 - Fibras con baja tinción, escasa actividad oxidativa.

Como hemos apreciado en los grupos anteriores analizados con las diferentes técnicas histoenzimológicas, en este grupo también se mantiene la disposición fibrilar en mosaico, en donde las fibras tipo I se asocian en un número reducido, de dos a cuatro y se disponen en el centro de una de las piezas del mosaico, las fibras tipo IIa y IIb se encuentran rodeando a las anteriores, y de forma similar al grupo anterior se destaca la presencia de nichos aislados de fibras alteradas, pero la imagen que presenta los músculos de este grupo y que lo diferencia de los anteriores, es la presencia de un edema generalizado.

▪ Estudio morfométrico

Los resultados morfométricos del músculo *longissimus lumbaris* han sido los siguientes:

Tipo I: 11,09 ($\pm 1,23$) %; **tipo IIa:** 41,06 ($\pm 2,66$) %; **tipo IIb:** 44,69 ($\pm 5,07$) %; **fibras alteradas:** 19,76 %.

En tanto que los datos que hemos obtenido de los estudios con hematoxilina-eosina son los siguientes:

Volumen: 388,84 μm^3 ($\pm 32,95$); **diámetro máximo:** 15,93 μm ($\pm 2,38$); **diámetro mínimo:** 9,67 μm ($\pm 0,39$); **diámetro medio:** 14,22 μm ($\pm 0,42$); **perímetro** 45,76 μm ($\pm 9,57$); **FF:** 0.81 ($\pm 0,04$).

$V_V(\text{nucl/tis})$ (%): 2,9 ($\pm 0,8$); **$S_V(\text{nucl/tis})$ (mm^{-1})**: 14,8 ($\pm 8,93$); **$Q_A(\text{nucl/tis})$ (mm^{-2})**: 1402 ($\pm 83,45$).

El músculo *longissimus dorsi*, presenta la siguiente distribución porcentual de sus fibras:

Tipo I: 11,56 ($\pm 1,96$) %; **tipo IIa:** 41,43 ($\pm 3,03$) %; **tipo IIb:** 45,76 ($\pm 4,09$) %; **fibras alteradas:** 14,21 %

Las medidas generales de las fibras de este músculo son las siguientes:

Volumen: $387,8 \mu\text{m}^3$ ($\pm 36,52$); **diámetro máximo:** $9,38 \mu\text{m}$ ($\pm 1,63$);
diámetro mínimo: $9,91 \mu\text{m}$ ($\pm 0,38$); **diámetro medio:** $13,86 \mu\text{m}$ ($\pm 0,39$);
perímetro $53,44 \mu\text{m}$ ($\pm 3,76$); **FF:** $0,97$ ($\pm 0,05$).

$V_v(\text{nucl/tis})$ (%): $4,1$ ($\pm 0,4$); **$S_v(\text{nucl/tis})$ (mm^{-1})**: $19,3$ ($\pm 2,39$); **$Q_A(\text{nucl/tis})$**
 (mm^{-2}): 1423 ($1,67$).

5.4. Grupo CMNs

- **Estudio estructural y ultraestructural**

En el grupo tratado con monocitos el músculo mostró una proporción normal entre el tejido muscular y el tejido conectivo. La fibra muscular se manifestó como una fibra multinucleada, de núcleos periféricos, organizándose las fibrillas con las estrías normales. Con la técnica del tricómico pudimos confirmar una relación evidente entre todos sus componentes (Fig. X).

La ultraestructura que presentaron las fibras fue relativamente clásica. Los núcleos se dispusieron junto a la membrana plasmática que a su vez se relacionó con un microambiente muy denso, con la existencia de

invaginaciones que configuraron los túbulos “T”. El elemento de mayor importancia fueron las miofibrillas, lo primero que debemos indicar es que estas fibrillas contráctiles se dispusieron paralelas unas a otras y distribuidas longitudinalmente por todo el volumen celular, y en ningún momento cambiaron de sentido (Fig. X).

En este grupo tratado con monocitos, al microscopio óptico destacaron grupos de células pequeñas multinucleadas, que se identificaron con células satélites o mioblastos. Su ultraestructura mostró unas células de bordes irregulares, incluso siendo difícil identificar sus bordes, destacándose la presencia de numerosos núcleos y lo que fue más importante material contráctil de miosina y actina, formando miofibrillas.

▪ Estudio histoenzimológico

Por la similitud que presentan estudiaremos ambos músculos conjuntamente: Músculo *longissimus dorsis* y Músculo *longissimus lumbaris*.

A la vista de los resultados obtenidos de las fibras de los dos músculos, apreciamos que desde el punto de vista histoquímico, están integrados por

fibras tipo I, actividad mATPasa alcalino- lábil, y ácido-estable, y con alta capacidad oxidativa, y por dos tipos de fibras II: una con actividad mATPasa alcalino-estable y ácido-lábil a pH 4.3; y otra con capacidad oxidativa variable, y que se diferencian entre sí, principalmente, por el grado de integridad tintorial que ofrecen frente a los pH alcalinos. Por esta razón pasamos a denominar a éstas como fibras IIalcalino-intensas, fibras IIa, y las II alcalino-moderadas denominadas fibras IIb.

Con las técnicas para la detección de las enzimas **mATPasa**, con las preincubaciones alcalinas a un pH 10.3, se diferencian los tres tipos de fibras:

- Fibras de tinción intensa, oscuras, actividad mATPasa alcalino-estable.
- Fibras de tinción moderada o intermedia, actividad mATPasa alcalino-estable.
- Fibras de tinción clara, actividad mATPasa alcalino-lábil.

Con la preincubación ácida realizada a pH 4.6, también se identifican tres tipos de fibras:

- Fibras de tinción intensa, oscuras, actividad mATPasa ácido-estable.
- Fibras de tinción moderada o intermedia, actividad mATPasa ácido-estable.
- Fibras de tinción clara, actividad mATPasa ácido-lábil.

En tanto que con las preincubaciones ácidas a pH 4.3 sólo ha sido posible determinar dos tipos de fibras:

- Fibras de tinción intensa, oscuras, actividad mATPasa ácido-estable.
- Fibras de tinción clara, actividad mATPasa ácido-lábil.

Finalmente el comportamiento con la Técnica NADH-TR, para comprobar la capacidad oxidativa de las fibras, se ha determinado que los tres tipos de fibras son: con alta actividad oxidativa, fibras teñidas intensamente; fibras de tinción moderada o intermedia, con moderada capacidad oxidativa; y fibras con baja tinción, con escasa actividad oxidativa.

▪ Estudio morfométrico

En los estudios morfométricos realizados en este músculo el porcentaje de sus fibras es la siguiente:

Longissimus dorsi:

Tipo I: 9,79 %; tipo IIa: 42,95 %; tipo IIb: 47,23%.

Longissimus lumbaris:

Tipo I: 9,87 %; tipo IIa: 43,76 %; tipo IIb: 46,37 %.

Y en los estudios tradicionales la morfometría de los diferentes parámetros se expone a continuación:

Longissimus dorsi:

Volumen: 432,60 μm^3 ($\pm 18,54,54$); **diámetro máximo:** 15,50 μm ($\pm 1,89$); **diámetro mínimo:** 9,91 μm ($\pm 0,38$); **diámetro medio:** 13,86 μm ($\pm 0,39$); **perímetro** 53,44 μm ($\pm 3,76$); **FFEL:** 0.878 ($\pm 0,07$); **FFPE:** 0.869 ($\pm 0,09$).

$V_V(\text{nucl/tis})$ (%): 4,1 ($\pm 0,4$); **$S_V(\text{nucl/tis})$ (mm^{-1})**: 19,3 ($\pm 2,39$); **$Q_A(\text{nucl/tis})$ (mm^{-2})**: 1423 (1,67%).

Longissimus lumbaris:

Volumen: 434,14 μm^3 (± 34); **diámetro máximo:** 12,40 μm ($\pm 2,26$); **diámetro mínimo:** 6,31 μm ($\pm 0,82$); **diámetro medio:** 7,64 μm ($\pm 0,61$); **perímetro** 28,34 μm ($\pm 4,73$); **FF:** 0.82 ($\pm 0,07$).

$V_V(\text{nucl/tis})$ (%): 0.9 ($\pm 0,1$); **$S_V(\text{nucl/tis})$ (mm^{-1})**: 7,1 ($\pm 2,15$); **$Q_A(\text{nucl/tis})$ (mm^{-2})**: 575 ($\pm 35,72$).

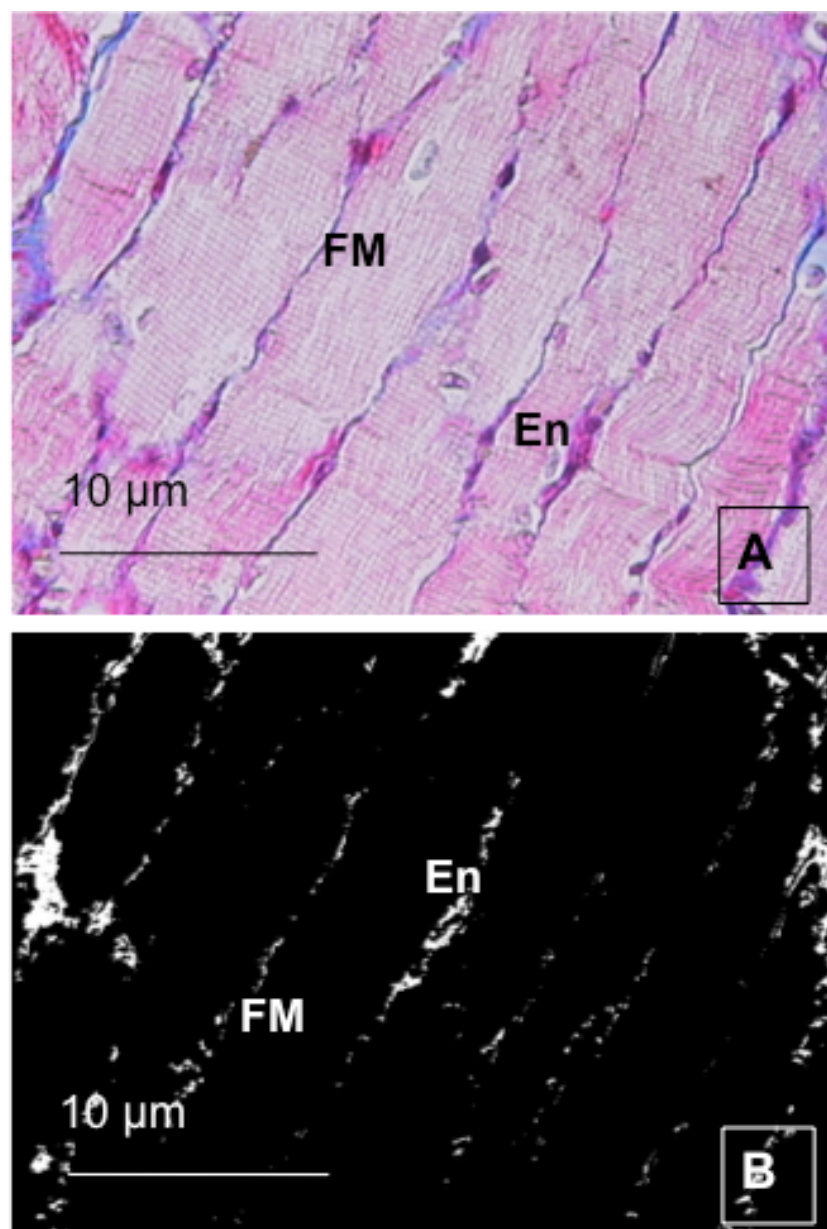


Figura 19: Cambios histopatológicos en musculo. Grupo Control.
A, B: Imagen al microscopio óptico de la section de fibras musculares. Técnica de tricrómico de Masson. Fibras musculares (FM) rodeadas por un endomisio delgada (En).

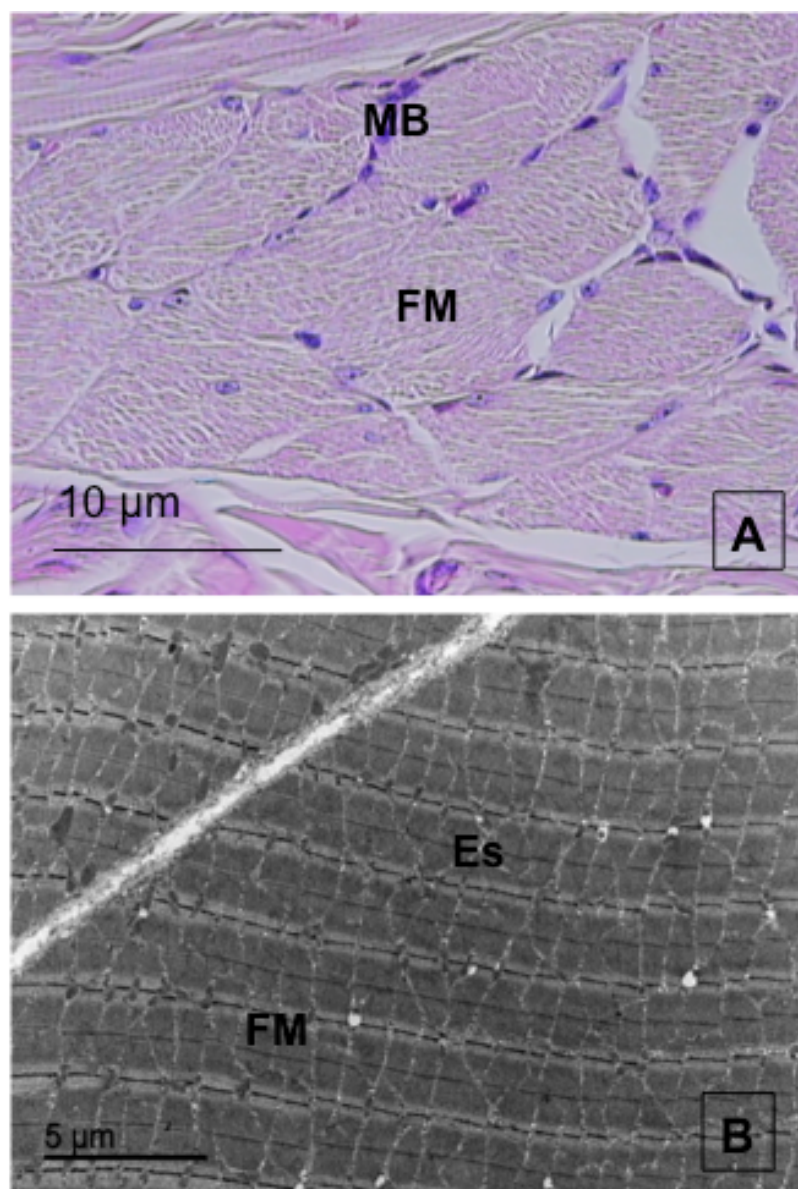


Figura 20: Cambios histopatológicos en músculo. Grupo Control.
A.: Imagen al microscopio óptico. Fibras musculares aparentemente normales (FM), y zona de asociación de mioblastos (MB).
B.: Imagen ultraestructural. Fibras musculares (FM), con estrías aparentemente normales (Es).

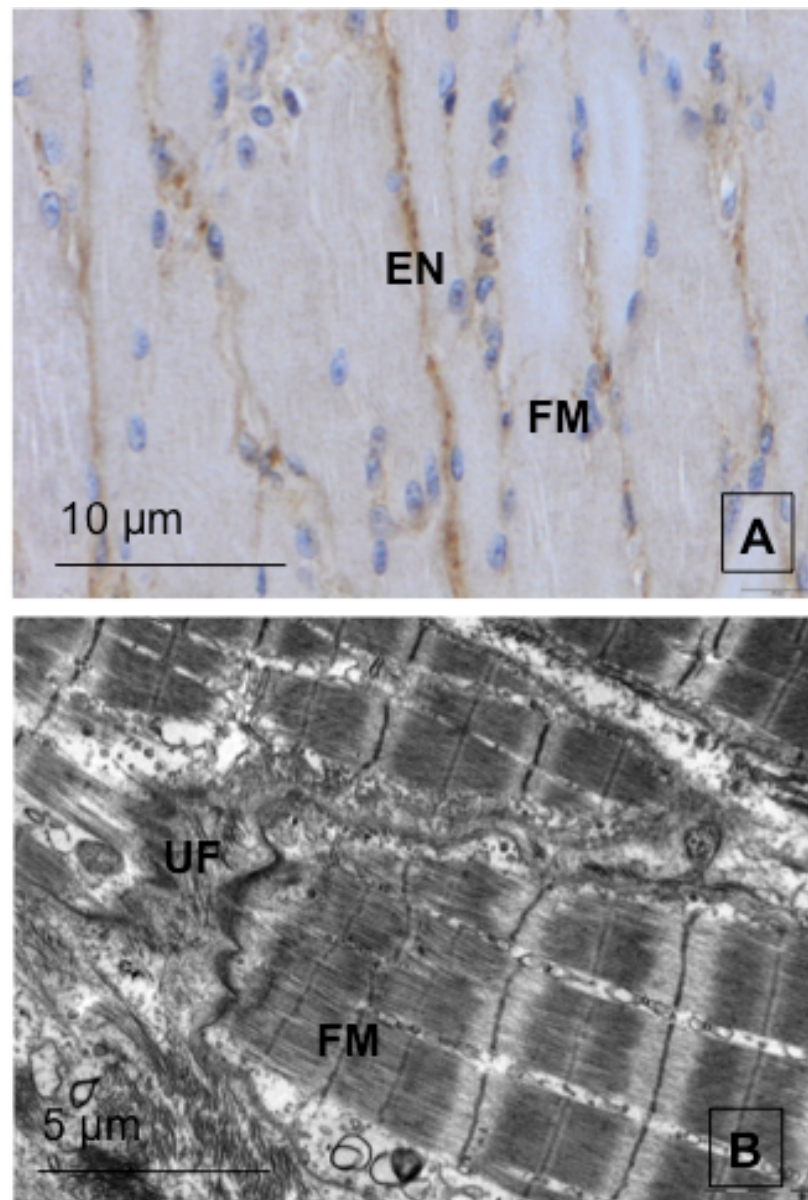


Figura 21: Cambios histopatológicos en músculo. Grupo Control.
A: Imagen al microscopio óptico de la sección de fibras musculares. Se aprecian las fibras musculares (FM), rodeados de un delgado endomisio (En) que da positiva la reacción inmune.
B: Imagen ultraestructural. Fibras musculares (FM) aparentemente normales, con zona de uniones fibrosas entre ellas (UF).

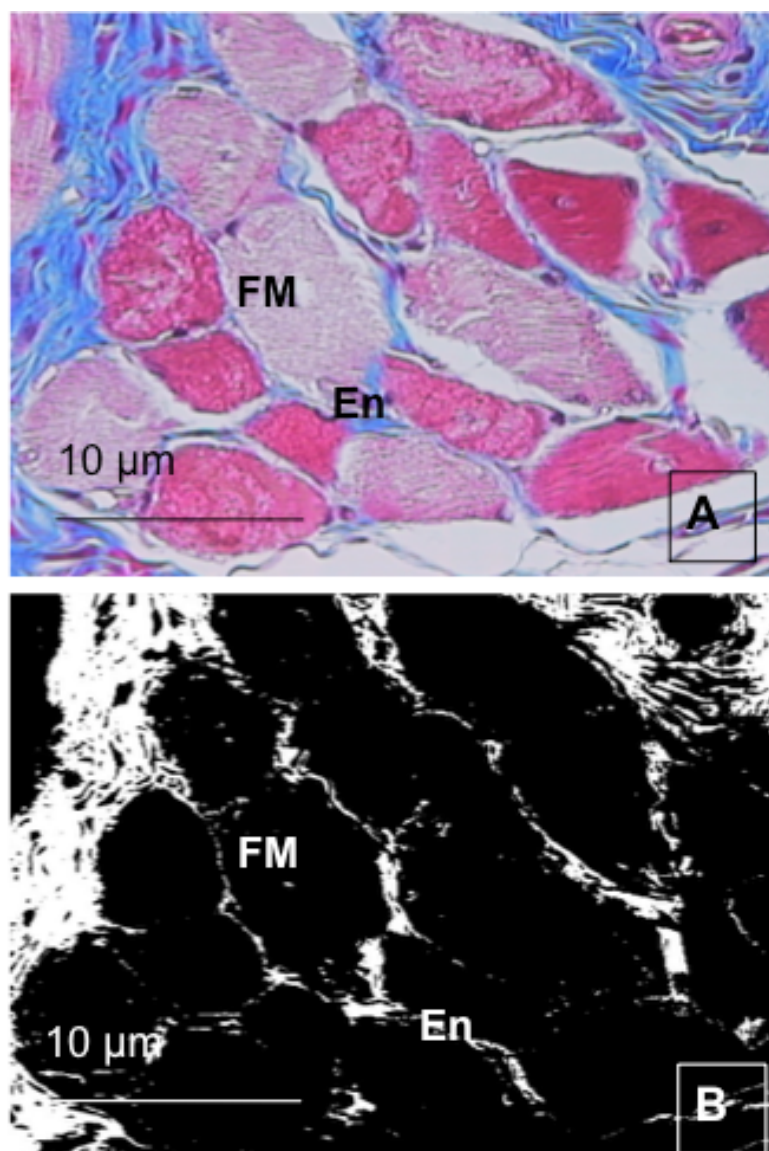


Figura 22: Cambios histopatológicos en musculo. Grupo tratado con BPA.

A, B: Imagen al microscopio óptico de la sección de fibras musculares. Técnica de tricrómico de Masson. A. Detalle de fibras musculares, degeneradas e hipertróficas (FM), rodeadas de un grueso endomisio (En). B. Contornos de las fibras musculares (FM), rodeados de gruesas bandas de endomisio (En).

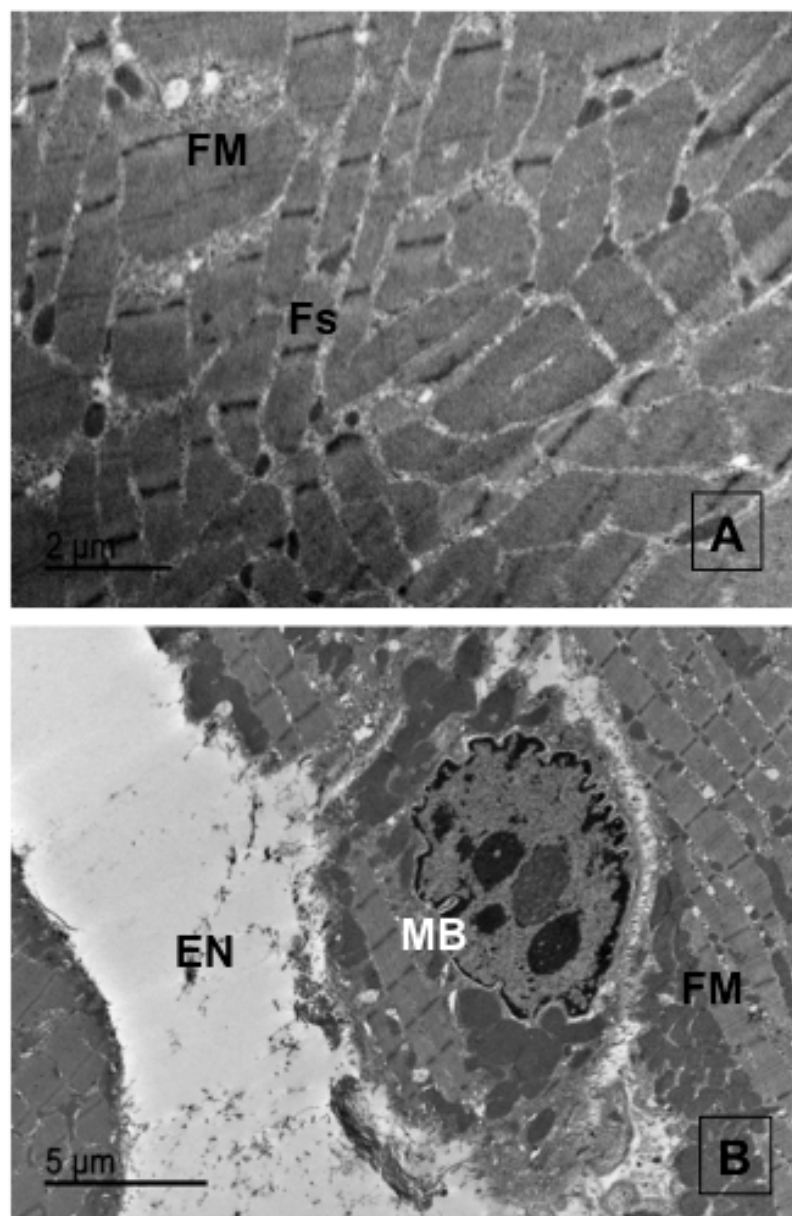


Figura 23: Cambios histopatológicos en musculo. Grupo tratado con BPA.

A, B: Imagen ultraestructural. A. detalle de fibras musculares (FM), que disponen de forma irregular a las miofibrillas (En). B. detalle de fibra muscular (FM), en relación de mioblastos degenerados (MB), rodeados por un endomisio con edema (En).

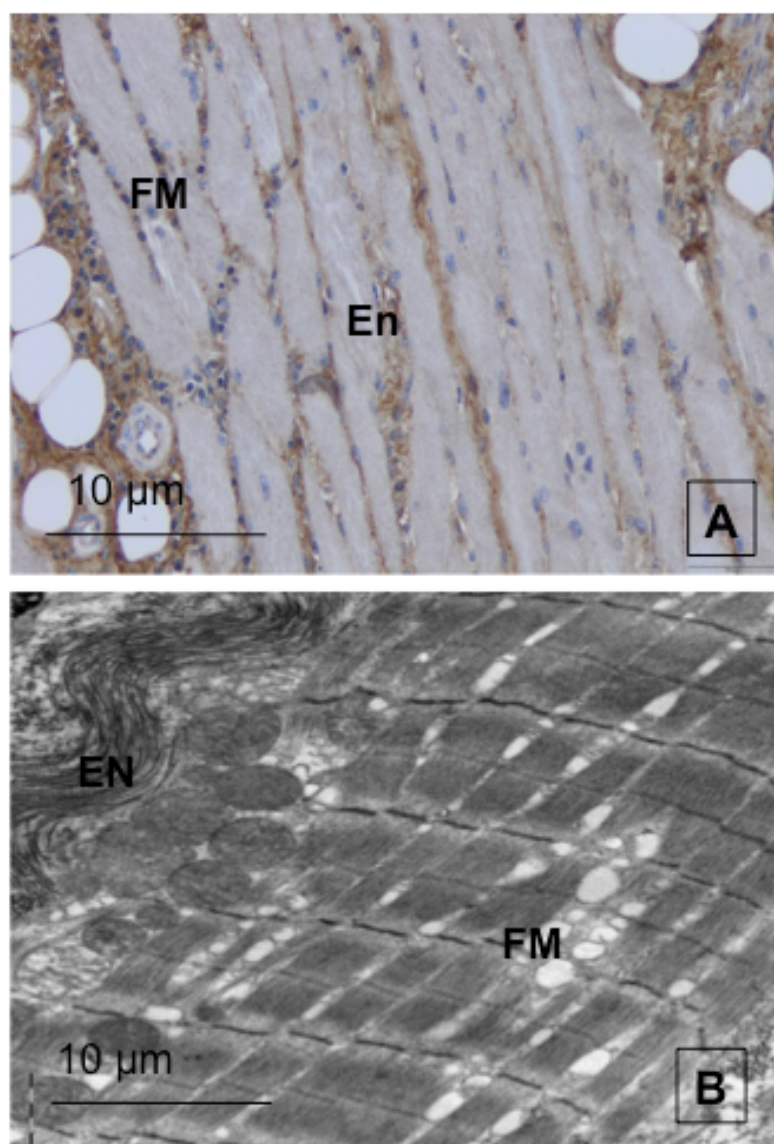


Figura 24: Cambios histopatológicos en musculo. Grupo tratado con BPA.

A: Imagen al microscopio óptico de la sección de fibras musculares. Se aprecian las fibras musculares (FM), rodeados por gruesos bandas de endomisio (En) que da positiva la reacción inmune.

B: Imagen ultraestructural. Fibras musculares vacuolizadas (FM), rodeadas de una banda fibrosa de endomisio (En).

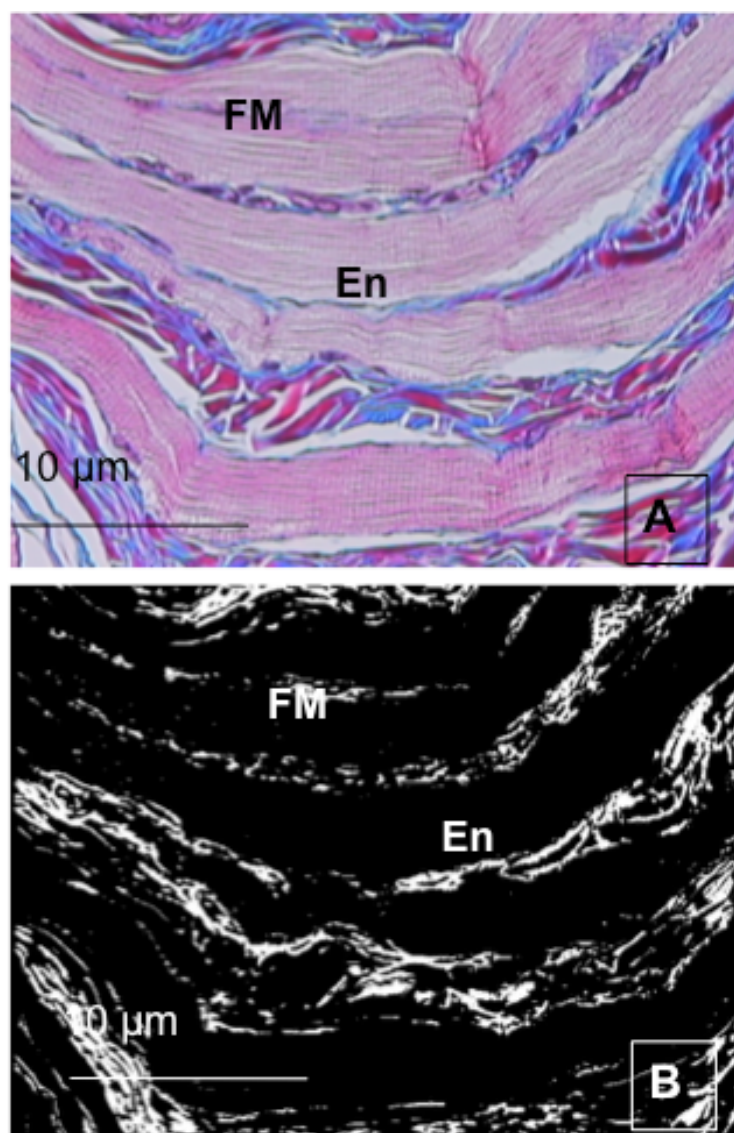


Figura 25: Cambios histopatológicos en músculo. Grupo retirada BPA.

A, B: Imagen al microscopio óptico de la sección de fibras musculares. Técnica de tricrómico de Masson. Fibras musculares hipertróficas (FM), rodeadas de un grueso endomisio (En). B. Se aprecia los contornos de las fibras musculares (FM), rodeados de gruesas bandas de endomisio (En). Fibras musculares regeneradas (FM), rodeadas de un endomisio fibroso (En).

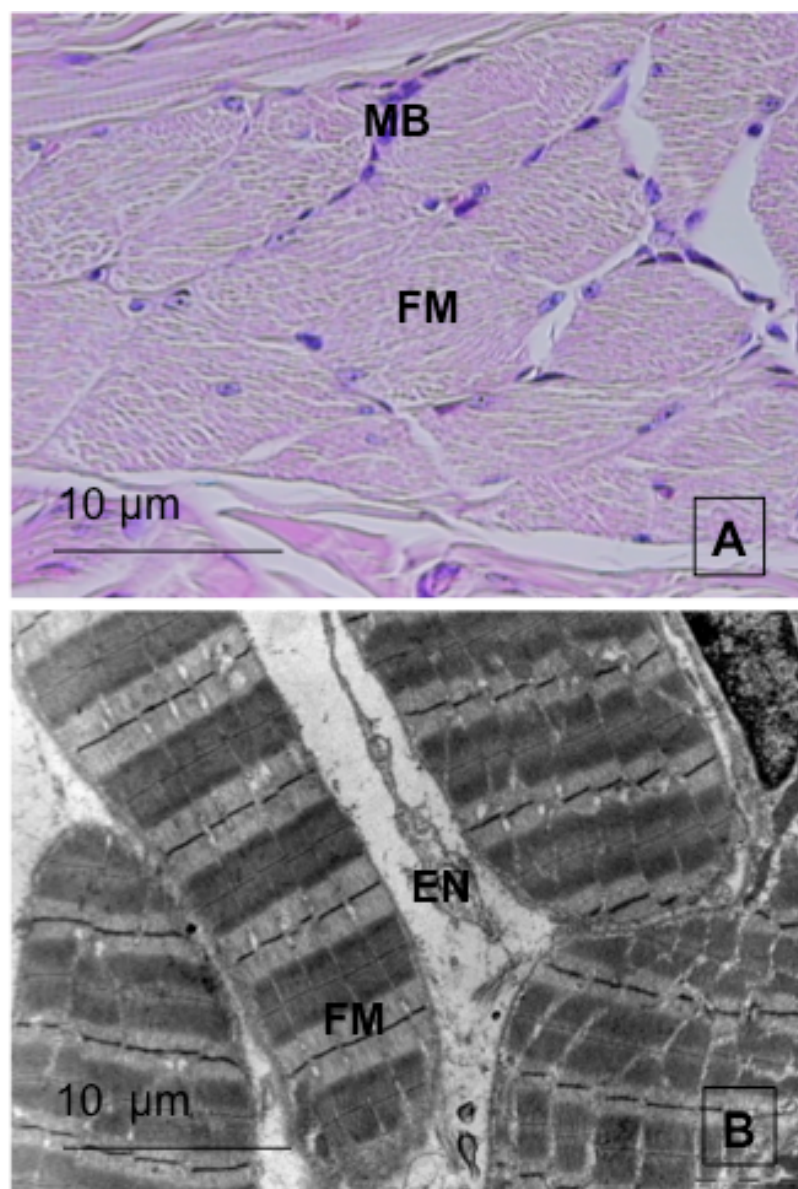


Figura 26: Cambios histopatológicos en músculo. Grupo retirada BPA.

A.: Imagen al microscopio óptico. Se destacan fibras musculares hipertrofiadas (FM), asociadas a mioblastos (MB).

B.: Imagen ultraestructural. Detalle de fibras musculares, que muestran sus estrías aparentemente normales (FM), rodeadas por gruesos endomisios fibrosos y con edema (En).

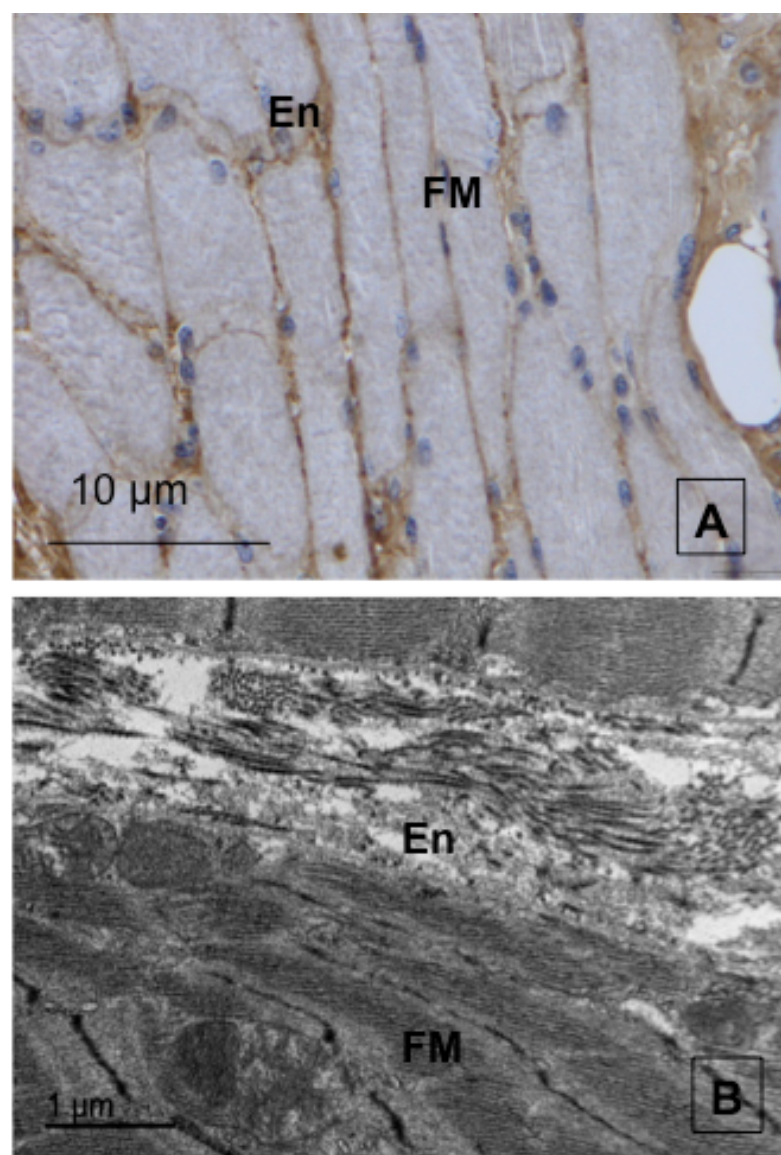


Figura 27: Cambios histopatológicos en musculo. Grupo retirada BPA.

A: Imagen al microscopio óptico de la sección de fibras musculares. Se aprecian las fibras musculares (FM), rodeados por gruesos bandas de endomisio (En) que da positiva la reacción inmune.

B.: Imagen ultraestructural. Fibras musculares regeneradas (FM), rodeadas de un endomisio fibroso (En).

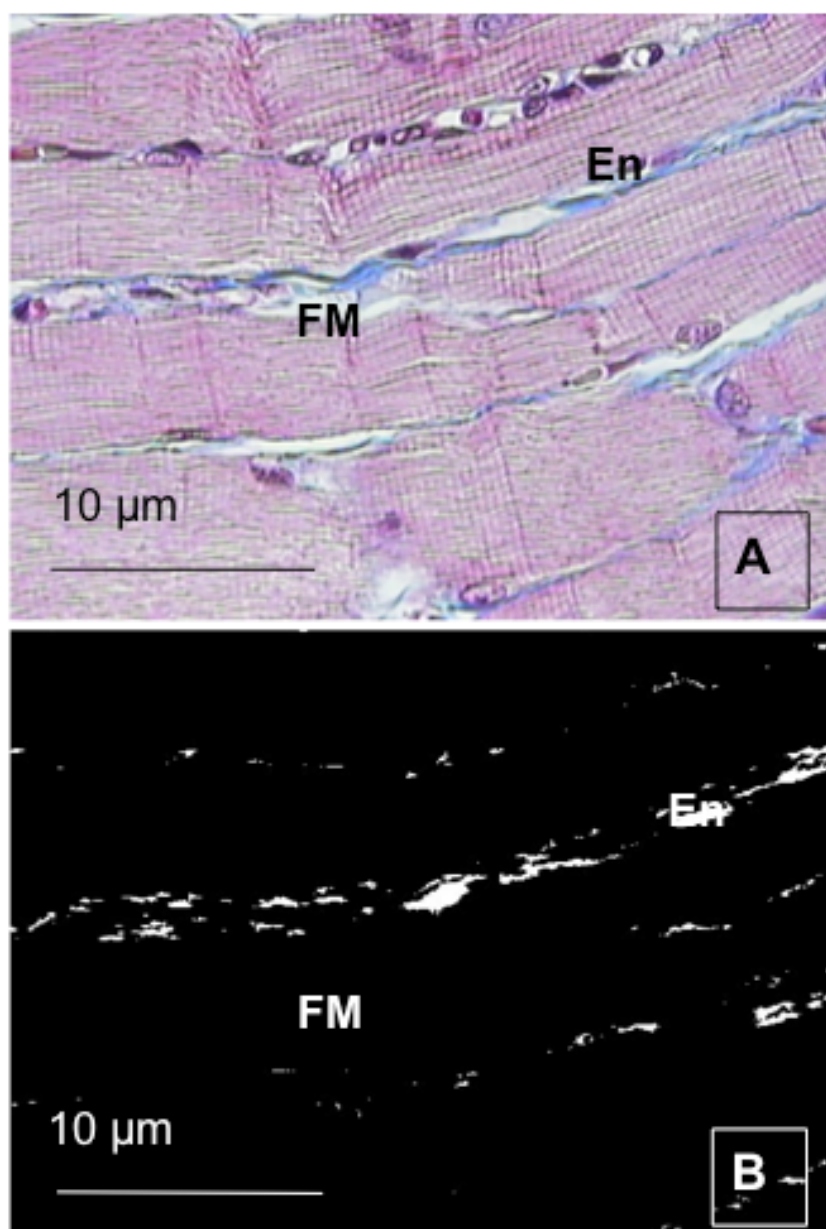


Figura 28: Cambios histopatológicos en musculo. Grupo tratado con monocitos .

A, B: Imagen al microscopio óptico de la sección de fibras musculares. Técnica de tricrómico de Masson. A. Fibras musculares (FM) rodeadas por un endomisio delgado (En). B. Se aprecia las fibras musculares (FM) rodeadas por un endomisio delgado (En).

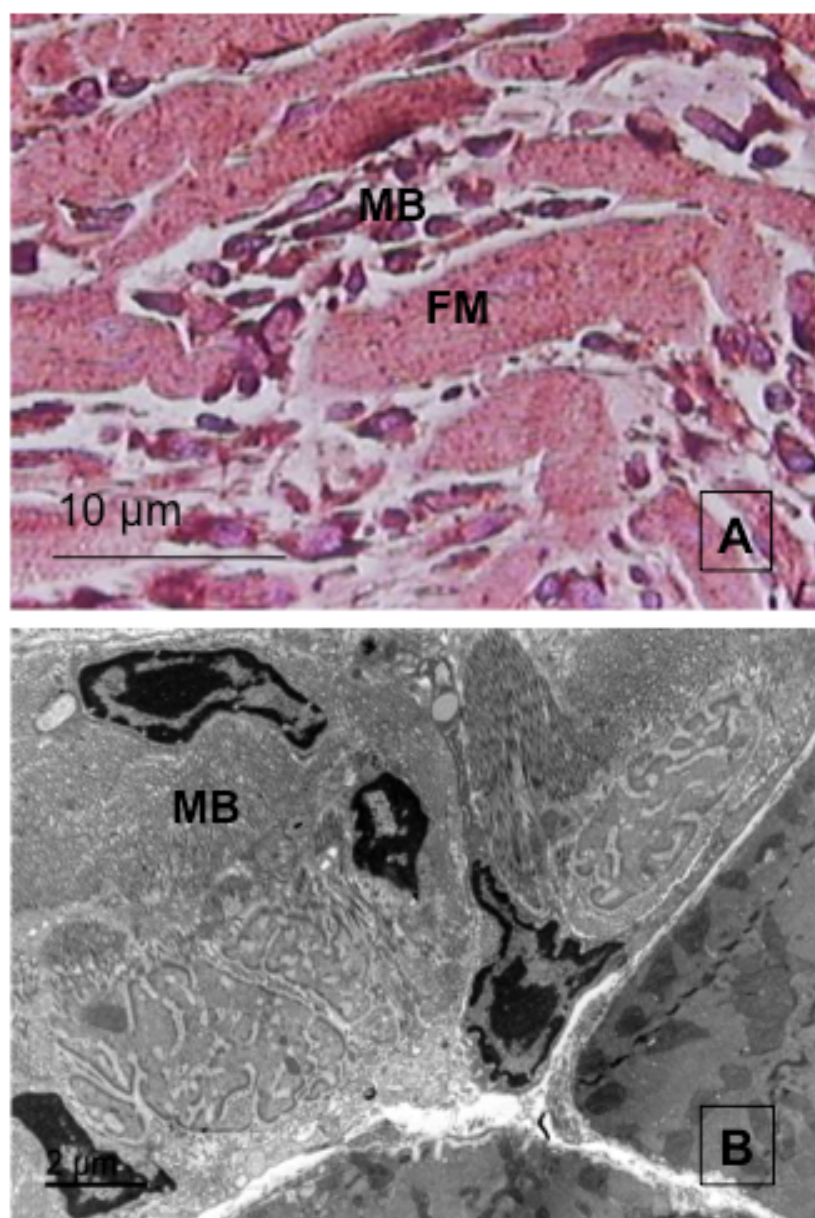


Figura 29: Cambios histopatológicos en músculo. Grupo tratado con monocitos .

A.: Imagen al microscopio óptico. Presencia de acumulos de mioblastos (MB).

B.: Imagen ultraestructural. Se destaca la presencia mioblastos (MB).

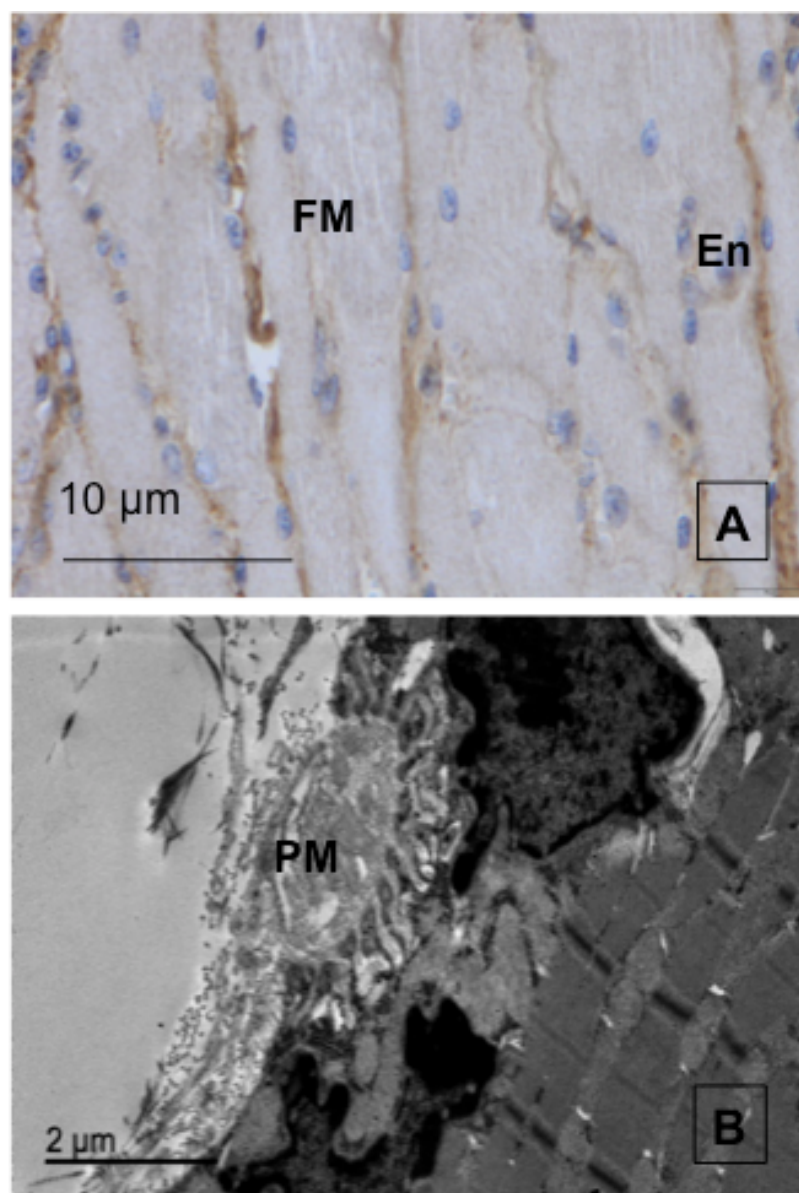


Figura 30: Cambios histopatológicos en músculo. Grupo tratado con monocitos .

A.: Imagen al microscopio óptico de la sección de fibras musculares. Se aprecian las fibras musculares (FM), rodeados de un delgado endomisio (En) que da positiva la reacción inmune, B.: Imagen ultraestructural. Se destaca la innervación de las fibras musculares, por placas motoras (PM).

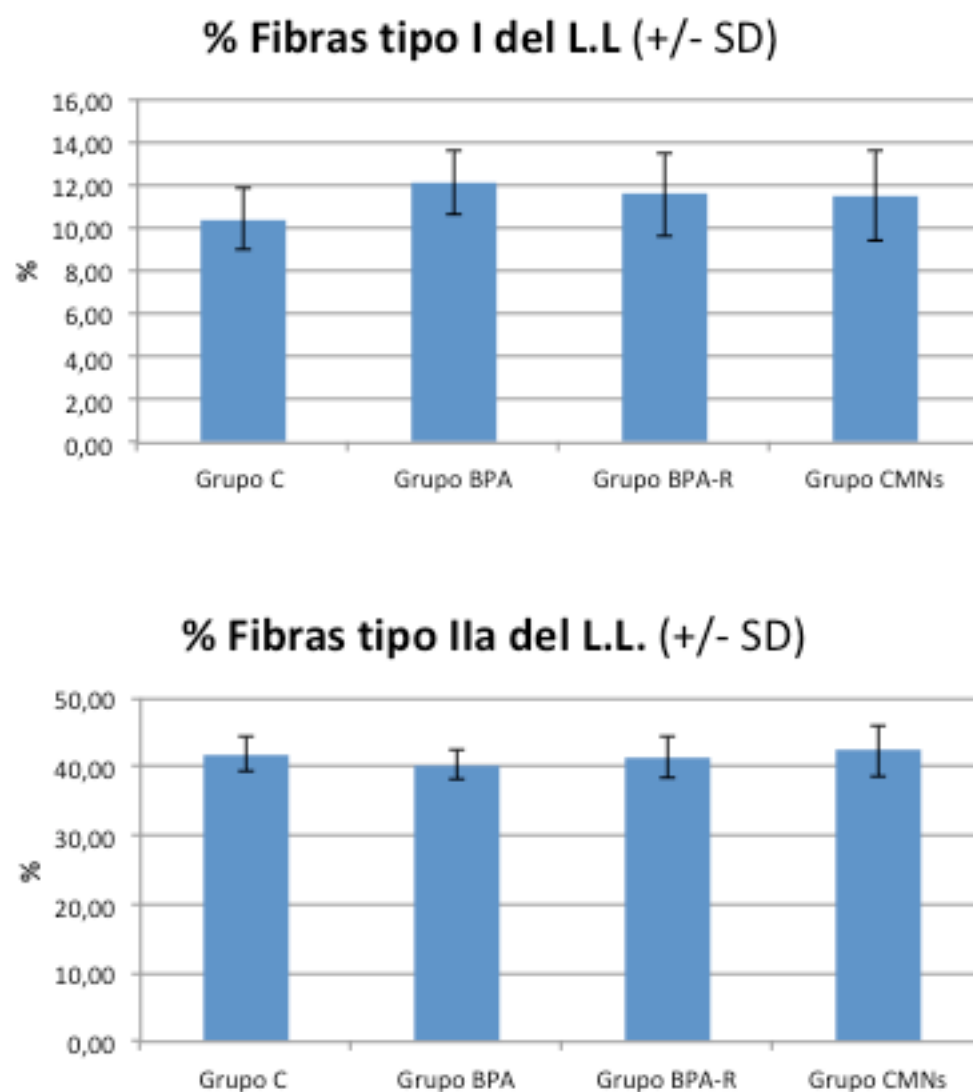


Figura 31: Morfometría. % Fibras tipo I y IIa *Longissimus Lumbaris*

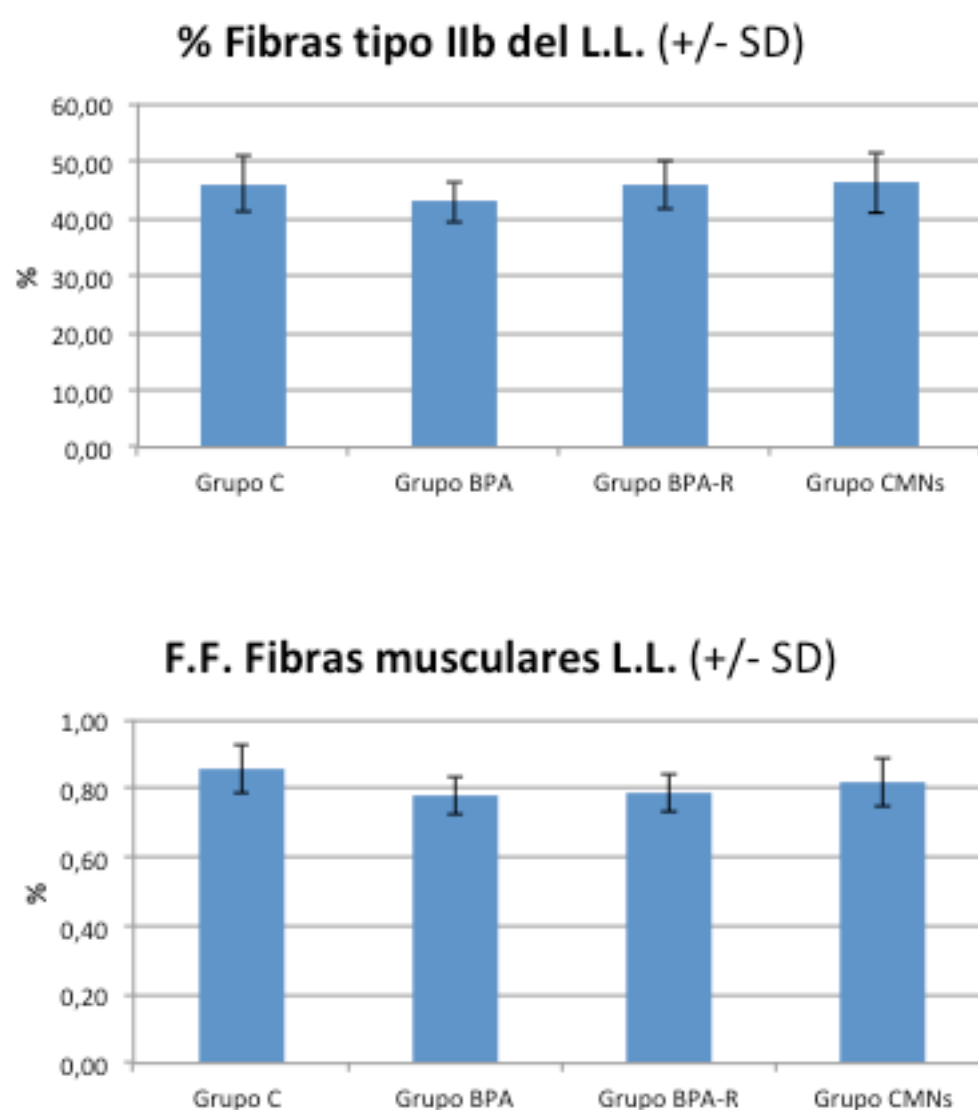


Figura 32: Morfometría. % Fibras tipo IIb y F.F. *Longissimus Lumbaris*

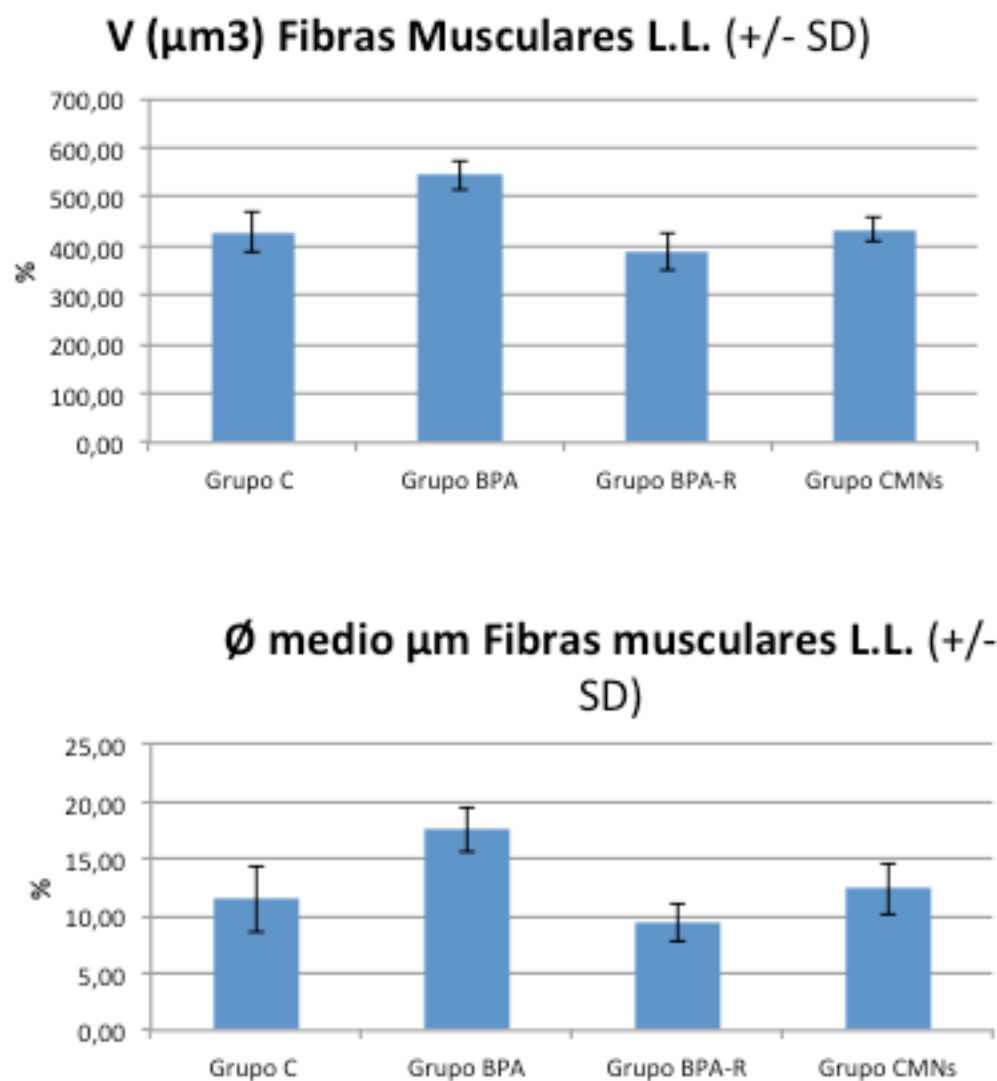


Figura 33: Morfometría. Volumen (μm^3) Fibras Musculares y diámetro medio de las fibras musculares *Longissimus Lumbaris*

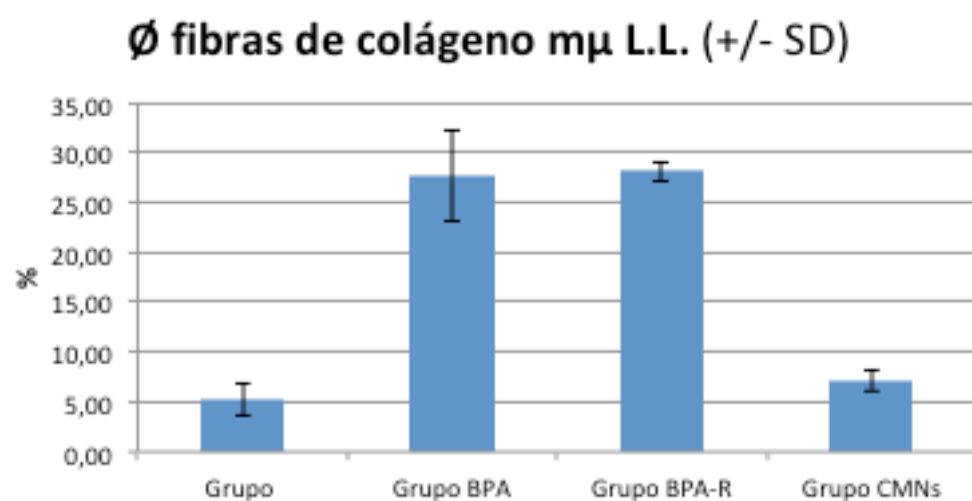


Figura 34: Morfometría. Diámetro medio de las Fibras de colágeno en el *Longissimus Dorsis*

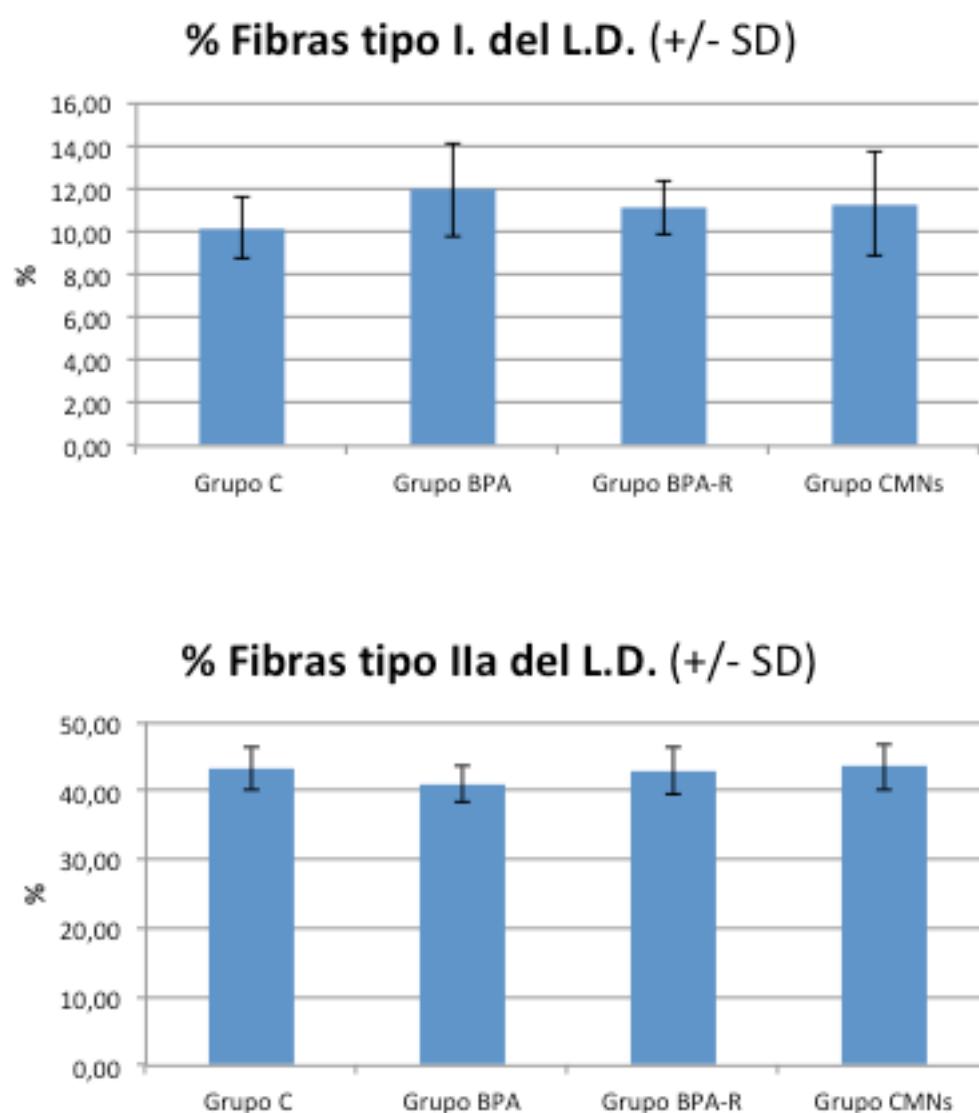


Figura 35: Morfometría. % Fibras tipo I y IIa *Longissimus Dorsis*

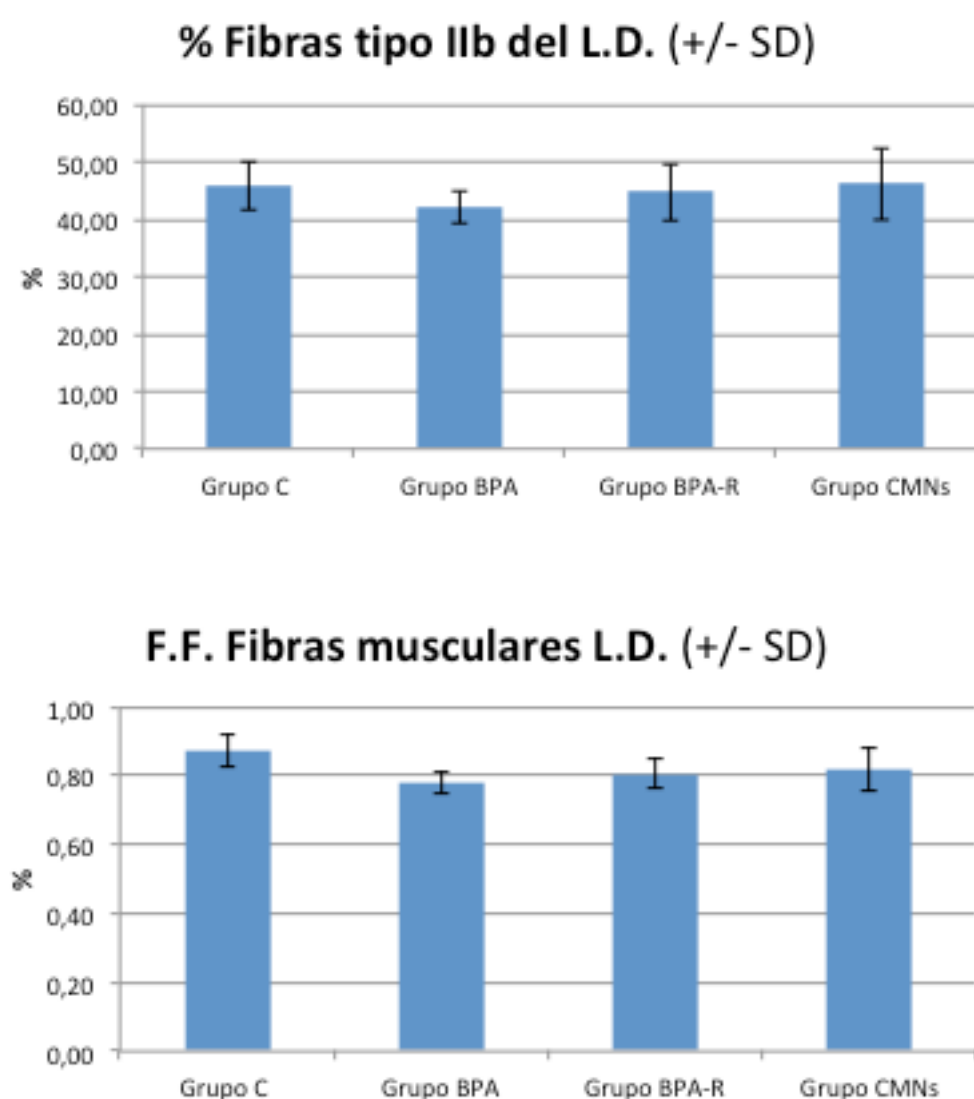


Figura 36: Morfometría. % Fibras tipo lib y F.F. Fibras Musculares en Longissimus Dorsis

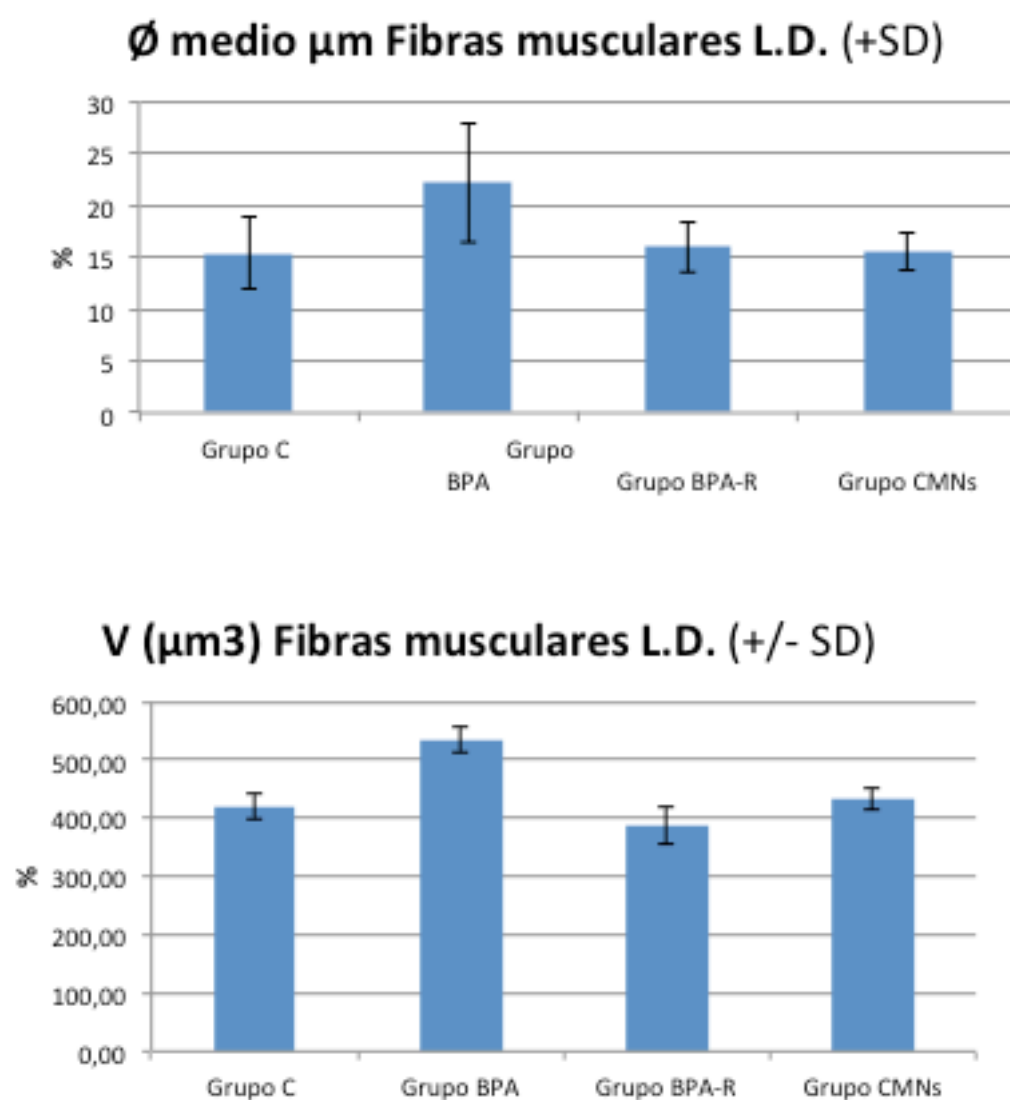


Figura 37: Morfometría. Diámetro medio de las Fibras musculares y Volumen (μm^3) de las Fibras musculares en *Longissimus Dorsis*

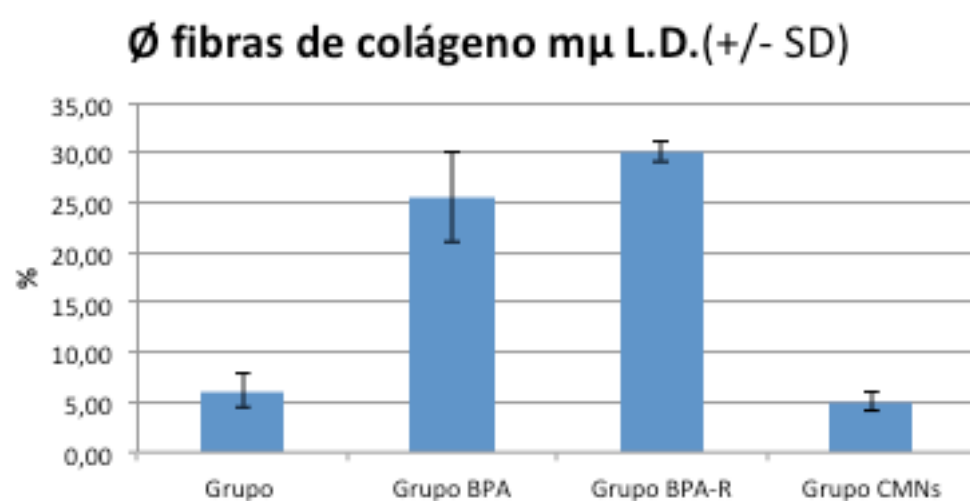


Figura 38: Morfometría. Diámetro medio de las Fibras de colágeno en el *Longissimus Dorsis*

6. Discusión

6. Discusión

En patología experimental in vivo, resulta imprescindible disponer de animales que muestren una alteración muscular y que sirvan de modelo para conocer el efecto de los posibles tratamientos. Cuando esto ocurre, resulta relativamente fácil plantear una experimentación para conocer la patogenia y así intentar concretar protocolos de tratamientos de la enfermedad. Por ello hemos realizado el presente estudio en minipig como modelo experimental, que ya han sido usado como animales de experimentación en experiencias previas con BPA, observándose que se reproducen bien la enfermedad o procesos patológicos parecidos.

El BPA es un disruptor endocrino capaz de causar desequilibrios en el sistema hormonal a concentraciones muy bajas con posibles repercusiones sobre la

salud. Sus efectos tóxicos se deben al consumo de alimentos que han sido contaminados por contacto con materiales que contienen esta sustancia, tales como envases, latas o recipientes de muy diversa clase. La amplia distribución de productos con BPA, especialmente en los países desarrollados, provoca una exposición continua de la población, afectando a todas las edades (desde fetos a ancianos). La presencia continua de este disruptor en el organismo se ha relacionado con un mayor riesgo de padecer diversos trastornos orgánicos.

En la actualidad, la EFSA mantiene que el uso de BPA es seguro para el uso humano. A pesar de ello, y ante los numerosos estudios en animales que parecen demostrar lo contrario, este organismo está llevando a cabo una reevaluación de su estimación sobre el nivel de riesgo del bisfenol A. Esta nueva evaluación se está realizando en dos etapas: en la primera se tiene en cuenta la exposición a esta sustancia y en la segunda, los aspectos que atañen a la salud humana. Los resultados no se conocerán hasta el año 2021.

Como hemos podido comprobar en la bibliografía, la propia experiencia de los miembros de las áreas de Toxicología y de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, en los estudios realizados con disruptores endocrinos como son los Bifenol A, estas sustancias tienen acciones negativas prácticamente en todas sus funciones, destacándose el sistema endocrino, procesos tumorales y sobre todo lo que a nosotros nos interesa el sistema locomotriz, en sus músculos y tendones.

El BPA es un componente de plásticos y envases de alimentos, y es uno de los químicos producidos en el mayor volumen en todo el mundo (Lang et al., 2008). Los efectos a dosis bajas de los productos químicos disruptores endocrinos como el BPA se producen mediante señalización endocrina que actúan como amplificadores potentes, provocando cambios importantes en la función celular en respuesta a concentraciones extremadamente bajas (Welshons et al., 2003).

La acción del BPA como disruptor endocrino ha sido ampliamente estudiado (Molina et al., 2013; Vanderberg et al., 2013; Canesi & Fabbri, 2015; Jedeon et al., 2016; Lora et al., 2016; Rhaman *et al.*, 2016; Barasona et al., 2017), si bien su efecto como xenoestrógeno a nivel del tejido muscular no ha sido evaluado de la misma forma (Indumathi et al., 2013; Mortazavi et al., 2013; Wang et al., 2013; Gimenez et al., 2016). Due to its importance as an environmental pollutant y la posible exposición a través de la dieta, nos planteamos como objetivo de este estudio la evaluación de los posibles efectos que podrían tener a nivel del tejido muscular la exposición continuada de BPA, así como la capacidad de recuperación tras la retirada del mismo, y si el tratamiento con monocitos, aplicado en patologías musculares de otra etiología, al aplicarse en lesiones originadas por EDCs podrían ser efectivos.

El presente estudio de investigación consta de tres fases diferentes, en primer lugar estudiamos las alteraciones que el BPA produce en las fibras musculares, y de forma paralela, analizamos las modificaciones que acontecen en los fibrocitos y fibras

de colágeno. En segundo lugar y una vez retirado el tratamiento con BPA, estudiamos como evolucionan estas lesiones, y por último evaluamos si los factores de tratamiento paracrin, concretamente monocitos medulares, que actúan por acción directa sobre las fibras musculares y conectivas puedan provocar una recuperación de las mismas.

Los factores de crecimiento plaquetario tienen su acción sobre los mioblastos, en tanto las sustancias paracrin de los monocitos de medula, actúan indistintamente sobre los mioblastos y las fibras degeneradas.

Son muy numerosos los estudios en lo que se evalúa la toxicidad del BPA utilizando roedores o peces como biomodelos (Hatef et al., 2012; Lopez-casas et al., 2012; Wang et al., 2013), y son pocos los trabajos en los que emplean otras especies como modelo experimental (Gao et al., 2010; Choi & Jeung, 2003; Indumathi et al., 2013).

Es un hecho confirmado que el BPA, producen alteraciones degenerativas e incluso apoptóticas en las fibras musculares esqueléticas y en los tejidos conectivos que los envuelven, sobre todo en el endomisio, muy similares a las que se producen en los diversos traumatismos agudos y crónicos.

Dentro de las líneas de investigación que tienen nuestros Departamentos, que tratan de utilizar inicialmente las plaquetas y posterior cultivos de células activas y madres, en los tratamientos de traumatismo en el deporte, los tratamientos con BPA, nos proporciona un modelo animal muy aceptable para conocer la acción beneficiosas

de las células cultivadas y madres sobre cuadros lesionales producidos en diversos tipos de traumatismos.

Previamente en nuestro laboratorio, también se ha probado este modelo animal para conocer la acción de los factores de crecimiento plaquetarios sobre fibras musculares y tendones, y ante el éxito obtenido con el modelo animal, diseñamos y hemos realizado una experiencia utilizando cultivos de células activas fundamentalmente monocitos.

En nuestras experiencias previas hemos podido comprobar que en las intoxicaciones producidas por los disruptores endocrinos, se producen procesos degenerativos que afectan tanto a las células musculares como a los fascículos de fibras de colágeno de los tendones. Estas alteraciones se han ven perjudicadas por injerencias inflamatorias que alteran gravemente las degeneraciones, y son asiento no solo de pérdida de funcionalidad sino que también de roturas tendinosas. Los procesos inflamatorios se pueden considerar como vicariantes para contrarrestar las degeneraciones, pero estos procesos defensivos pueden ser negativos, ya que uno de los fenómenos que acarrea es la llegada de vasos al territorio tendinoso, lo que transforma a los mesotendones en gruesos cordones conectivos con los neovasos, pudiendo producir adherencias del tendón a las vainas con lo que se pierde movilidad. Estos punto de fijación tendinosa se acentúan al producirse indiscriminadamente colágeno III por parte de los fibroblastos cicatriciales. Hemos comprobado que la acción de los bifenoles son reversibles, por lo que al dejar de suminístralos se detiene

la acción degenerativa, pero debido al tipo de tejido conectivo fibroso, que forman los tendones, la recuperación total de los tendones es incompleta, sobre todo por mantenerse los puntos de adherencia del tendón a la vaina, que produce una zona de anclaje que les disminuye el movimiento de deslizamiento, y también porque el colágeno tipo III formado fruto a la cicatrización, carece de la capacidad de organizarse en gruesos fascículos longitudinal, y se suelen disponer como zonas fibrosas en el seno del tendón, con lo que pierde su capacidad de tracción.

Tanto en el tratamiento con BPA, como al retirarse el BPA y dejarlo solo recuperar, se mantienen el colágeno III inmerso en el colágeno I, esta situación produce que el colágeno III aumente la polimerización del tropocolageno, y en lugar de formar colágeno homogéneo con estrías, se detectan zonas muy engrosadas ovoides o alargadas con una densificación de sus estrías, que en procesos de cicatrización anormales de tendón se conocen como microqueloides y se transforman en zonas de rotura.

Una vez retirado el BPA, como hemos visto anteriormente, se detienen los procesos inflamatorios, al aplicarse sobre el tendón los factores de crecimiento plaquetarios, comprobamos una drástica disminución de los vasos, con lo que detienen la llegada de componentes inflamatorios, destacándose la pérdida de las adherencias tendinosas y el mesotendon se hace más fino y flexible.

Hemos podido comprobar procesos descritos en rotura tendinosa tratadas con plaquetas, y es que los fibroblastos cicatriciales disminuyen e incluso

desaparecen, y por otra parte una activación celular del tendocito, que aumenta el tamaño y desarrolla los organoides formadores de proteínas como son fundamentalmente el retículo rugoso y el complejo de Golgi, y además presentan una orientación longitudinal, paralelos a los fascículos colágenos. Por una parte la disminución de los fibroblastos cicatricial es la responsable que disminuya notablemente el colágeno III, y gracias a la activación de los tendocitos se favorece la formación del colágeno I, y debido a la disposición longitudinal de las células tendinosas este colágeno I, se dispone longitudinalmente al eje del tendón, favoreciéndose la formación de los fascículos fibrosos que incluso hemos podido comprobar que muestran ondulaciones en sentido longitudinal al eje tendinoso.

Por tanto, hemos podido comprobar que en las intoxicaciones producidas por los disruptores endocrinos, se producen procesos degenerativos que afectan tanto a las células musculares como a los fascículos de fibras de colágeno de los tendones. Estas alteraciones se ven perjudicadas por injerencias inflamatorias que alteran gravemente las degeneraciones, y son asiento no solo de pérdida de funcionalidad sino que también de roturas tendinosas. Los procesos inflamatorios se pueden considerar como vicariantes para contrarrestar las degeneraciones, pero estos procesos defensivos pueden ser negativos, ya que uno de los fenómenos que acarrea es la llegada de vasos al territorio tendinoso, lo que transforma a los mesotendones en gruesos cordones conectivos con los neovasos, pudiendo producir adherencias del tendón a las vainas con lo que se pierde movilidad. Estos puntos de fijación tendinosa

se acentúan al producirse indiscriminadamente colágeno III por parte de los fibroblastos cicatriciales.

Como planteamiento general, en este capítulo de discusión de nuestras investigaciones, queremos significar que nuestro trabajo ha consistido en conocer los beneficios y también las alteraciones que sufren los músculos, en concreto el *longissimus lumbaris* y el *longissimus dorsi*, mediante parámetros microscópicos tanto normales como modificados, con el uso del BPA y en casos de factores de crecimiento plaquetarios, como plantea Herrera, et al., (2001). Para nosotros el motivo fundamental que nos ha llevado a realizar este trabajo es conocer los fenómenos íntimos que acontecen sobre las fibras musculares para facilitar la comprensión de los resultados que posteriormente se pueden obtener del estudio de degeneraciones musculares.

Como indicamos en el capítulo de resultados, la acción hipertrófica del BPA sobre los músculos, es totalmente atípica, formando unas imágenes que en ningún momento puede corresponder a un aumento de la masa muscular normal.

En nuestro estudio observamos como la hipertrofia de las fibras musculares debida a la acción del BPA, se debió principalmente a un aumento del material contráctil. Este fenómeno se pudo detectar incluso al microscopio óptico por el aumento del tamaño de las fibras, pero sin duda alguna, como mejor se apreció fue usando el microscopio electrónico. Las miofibrillas se presentaron en número mayor y mostraron graves alteraciones. Por este motivo se detectó frecuentemente, tanto al microscopio óptico

como al electrónico, imágenes en las que las miofibrillas se dispusieron en arcadas, formándose las degeneraciones en huellas dactilares. Estas modificaciones pudieron llegar incluso a mostrar canalizaciones del citoplasma, siendo este tipo de lesiones previamente descritas por Giménez et al. (2016) además de por la acción de otras sustancias que pudieran actuar como anabolizantes (Pellegrino et al., 2004; Douillard et al., 2011).

Sin duda alguna la acción principal del BPA sobre las fibras musculares, motivo de nuestro trabajo, ha sido una hipertrofia manifiesta, como significan Lavoie, *et al.*, (2002). Aunque en nuestra experiencia hemos usado diferentes parámetros para su estudio, como han sido fundamentalmente técnicas histoenzimológicas y los aspectos morfológicos usuales al microscopio óptico, y las alteraciones ultraestructurales.

La hipertrofia de las fibras musculares por la acción de los disruptores, como presenta Choo, *et al.*, (1990), se debe principalmente a un aumento del material contráctil. Este fenómeno se puede detectar incluso al microscopio óptico por el aumento del tamaño de las fibras, pero sin duda alguna como mejor se aprecia es usando el microscopio electrónico. Las miofibrillas se presentan en número mayor, y este aumento, como tratara Huang, *et al.*, (2000), muestra graves alteraciones; por una parte estas miofibrillas pueden estar adelgazadas, pero en condiciones de tamaño normal se muestran en una disposición longitudinal irregular, y a veces localizadas en las zonas periféricas cambiando incluso el sentido de su distribución y formando la

degeneración en anillo de las fibras musculares hipertróficas, y finalmente también se describe una desorganización total del material contráctil de las fibras hipertróficas.

Tanto al microscopio óptico como al electrónico, las alteraciones que sufren los miocitos por la acción del BPA se pueden clasificar de tres tipos: Mecánicas, Degenerativas y Apoptóticas.

Como señala Chen, *et al.*, (2000) a veces la actividad de síntesis del BPA sobre diversos tipos de fibras musculares a veces, esta exacerbada, hasta el punto que se pierde la relación de continente y contenido. El número de las miofibrillas aumenta de forma tan rápida que prácticamente no caben en el seno de la membrana celular, por lo que éstas sufren unas reorganizaciones secundarias que modifican profundamente la forma de las fibras musculares. Por este motivo es frecuente detectar, tanto al microscopio óptico como al electrónico, imágenes en las que las miofibrillas se disponen en arcadas, formándose las degeneraciones en huellas dactilares. Estas modificaciones pueden llegar incluso a mostrar canalizaciones del citoplasma como indica Maltin, *et al.*, (1990).

Las lesiones de origen mecánico se deben a una descomposición entre el continente y contenido. La desorganización hormonal y sobre todo la hipertrofia muscular, favorecen a una síntesis rápida y en grandes proporciones de la proteínas contráctiles como la actina y la miosina, fenómeno que no va acompañado por el receptáculo sarcoplasmático, este fenómeno produce que las miofibrillas estén aumentadas en cantidad y tamaño, y que prácticamente no quepan en el interior de

las fibras musculares. Para compensar este procesos patológico, las miofibrillas adquieren formas anómalas y sobre todo mala distribución. Y es acompañada por una grandes hipertrofias, que a veces como se aprecia al electrónico, se produce invaginaciones de la membrana sarcoplasmatica, y al óptico se presentan cuadros en que estas invaginaciones producen canalizaciones internas, mostrando los núcleo en el interior de las fibras, a este proceso se le conoce como “canalizaciones fibrilares”.

La hipertrofia que se produce en las fibras por la acción del disruptores afecta igualmente al resto de sus componentes, descrito anteriormente por Hayes, *et al.*, (1997), destacándose una centralización de los núcleos, fenómeno que hemos encontrado además de un aumento total de dichos núcleos. Desde el punto de vista funcional, como describe Lynnh, *et al.*, (2001), hemos descrito una desorganización de los túbulos “T” y del retículo sarcoplásmico, lo que afectará a la contracción del músculo al presentar problemas la liberación de los iones de Ca^{++} , y por lo tanto reacciona de forma incompleta la actina sobre la miosina.

En relación a la acción toxica del BPA sobre los miocitos, se configura por una síntesis anómala de las miofibrillas, en que por un lado estas miofibrillas aumentan y se disponen en arcadas, dando la degeneración en huella dactilar y junto a estas fibras existen otras con una atrofia manifiesta, debido a una pérdida parcial de las miofibrillas.

Finalmente las miofibrillas tanto en los procesos mecánicos como tóxicos, su material contráctil sufre coagulaciones propias de los procesos apoptoticos.

La acción del BPA suele ser reversible, por lo que se presentan recuperaciones de las fibras que no se entraban muy afectadas, pero el resto terminan en apoptosis, que les lleva a una necrosis por coagulación.

En el grupo tratado con BPA destacamos, como indica Carter, et al., (1991) y si bien no lo hemos cuantificado, que el tejido graso tanto del endomisio como del perimisio prácticamente ha desaparecido, confirmándose así uno de los factores zootécnicos positivos por lo que se hace uso de este fármaco.

En las descripciones realizadas, en el campo ultraestructural, hemos apreciado que una de las diferencias más importantes entre el grupo control y el tratado con BPA, es la existencia en este último de agrupamientos de fibras que las hemos denominado alteradas, y se definen por una pérdida en la homogeneidad, junto a graves modificaciones de sus componentes básicos (Lavoie, *et al.*, 2002). La aparición de este tipo de fibra que resulta muy significativa para establecer su diferencia.

Al retirar el BPA, tanto al microscopio óptico como al electrónico, hemos detectado cierta recuperación, con imágenes de regeneración. Igualmente, por la modificación del medio externo celular se presentaron gran número de modificaciones tanto de las miofibrillas como del resto de componentes de las fibras.

En este grupo de retirada, las fibras musculares adquieren un aceptable grado de recuperación de las miofibrillas, como hemos descrito al estudiar los sarcomeros, lo mismo ocurre en las fibras tratadas con factores de crecimiento, por lo

que en ambos casos se puede considerar que las fibras han recuperado su vitalidad y funcionamiento. Pero el problema radica que en el endomisio de las fibras sin tratamiento, se produce una fuerte condensación de fibra de colágenos, en tanto que en las tratadas el colágeno es casi inexistente, y solo persiste los capilares, Este fenómeno nos indica que la recuperación en asos de tratamiento con factores plaquetarios la recuperación ha sido correcta tanto en la fibra como en el endomisio, en tanto que en la solo retirada, la fibra recupera su funcionalidad, pero a nivel del endomisio, la aparición masiva de fibras de colágeno, conlleva procesos de fibrosis, que hacen que estos músculos sean propensos a posteriores roturas.

Las fibras musculares son células que reaccionan frente a distintos estímulos produciendo un aumento de su tamaño o hipertrofia. Uno de los agentes que favorece el aumento de su tamaño es el β -agonista, pero en diferentes tratamientos con clenbuterol se hipertrofian, Apseloff, et al., (1993) y Lavoie, et al., (2002), siendo esta reacción reversible, ya que una vez que se suspenden los tratamientos se pierde el aumento del tamaño, Bakker, et al., (1998), e incluso la retirada del clenbuterol puede llegar a producir el efecto contrario, es decir una atrofia de las fibras musculares (Chen, et al., 2000 y Gil, et al., 2001).

Dentro de la existencia en el grupo BPA de los dos grandes grupos de fibras, normales y alteradas, unos de los patrones morfológicos que indica el alto grado de modificación celular es el factor de forma, que comparativamente es menor en las fibras normales que en las alteradas del grupo del bifenol A, indica el alargamiento de

estas células por lo que se considera una transformación íntima y profunda (Apseloff, *et al.*, 1993). Esta modificación en el factor de forma está más acentuada en las fibras alteradas, describiéndose fibras de secciones alargadas, convirtiéndose en un parámetro morfológico muy objetivable.

Como estudia Horne, *et al.*, (1990), la acción del BPA sobre los músculos y en particular sobre el *longissimus lumbaris* y el *dorsalis*, se cifra en un aumento de su masa sarcoplásmica, lo que conlleva graves dificultades funcionales de dichas fibras, por lo que los animales tratados realizan menos ejercicio, favoreciéndose todavía más el engorde de los animales por una disminución en las funciones metabólicas.

Uno de los procesos que tienen más importancia en la recuperación de las fibras musculares, es el estado en que queda el endomisio. De ahí que encontremos profundas diferencias entre los grupos de recuperación sin tratamiento, solo con la retirada del BPA, y el del posterior tratamiento con monocitos medulares tras la retirada del BPA.

En cuanto al cultivo de monocitos medulares, estos se observaron como células mononucleares, grandes, de aproximadamente 15 micras de diámetro. El citoplasma presentaba gránulos de tamaño y forma variable, rodeados por una unidad de membrana, un aparato de Golgi, moderada cantidad de mitocondrias, cisternas de retículo endoplasmático rugoso y gránulos con aspecto de lisosomas. Algunas células mostraban vesículas intracitoplasmáticas sin contenido y prolongaciones del citoplasma con aspecto de pseudopodos o de filopodios. En otras células, se

observaron dentro de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso, estructuras tubuloreticulares anastomosadas de 24 nm de diámetro. En algunos monocitos se logró identificar en el citoplasma la presencia de vesículas con numerosas partículas electrodensas redondeadas de 40 nm de diámetro, rodeadas por una envoltura de 10 nm de espesor. Las estructuras vesiculares mostraban un material electrodenso finamente reticulado en la parte central. Estas vesículas se ubicaron predominantemente en la región perinuclear, aunque en algunas células se localizaron hacia la periferia del citoplasma. No se pudo establecer alguna relación con el aparato de Golgi. Las vesículas estaban limitadas por una unidad de membrana. No se evidenciaron partículas vírales libres en el citoplasma o dentro del retículo endoplasmático rugoso, ni se detectaron viriones fuera de las células, en el espacio extracelular.

Los monocitos son un tipo de glóbulo blanco presente en la sistema sanguíneo. Estas células, son los leucocitos de mayor tamaño y representan casi el 8% de la célula blanca que recorre el torrente sanguíneo. Su función principal es proteger y defender al sistema inmune ante cualquier enemigo. Además, están destinados a eliminar microorganismos invasores y cualquier célula muerta.

Su composición inicia en la médula ósea, tienen un tiempo aproximado de 8 horas en la sangre, hasta que se impregnan en varios tejidos y órganos como el hígado, pulmones y el bazo. Este proceso los convierte en macrófagos. El tiempo total de vida productivos que tienen es de 4 días.

Su función es la de **cuidar y proteger al sistema inmune** ante bacterias y virus invasores que pueden trastocar la salud y estabilidad del organismo. Esta célula blanca tiene el poder de *convertirse en macrófagos*, esto lo hacen antes de consumir o eliminar los gérmenes que están provocando las infecciones.

Ellos **se desarrollan en la médula ósea**, inician un proceso de maduración en el que están listos para atacar cuando el organismo reciba amenazas fuertes de virus invasores. **La fagocitosis** es la forma más correcta de describir el *trabajo de los monocitos* en el sistema de defensas.

Los **leucocitos o glóbulos blancos**, son células esenciales para el *funcionamiento correcto del sistema inmune*. La **función primordial de la célula blanca**, es evitar que las defensas se vean acorraladas por bacterias, infecciones y virus que desestabilicen al organismo y nuestra salud. Como hemos dicho antes, los *leucocitos se dividen en 5 grandes grupos*, entre ellos tenemos a **los monocitos**.

Dentro de los glóbulos blanco agranulocitos se encuentran los linfocitos y monocitos, que apenas tienen granulaciones, y las escasas que poseen se denominan gránulos azurofilos, por teñirse con el colorante azur de metileno. Si bien ocurre en los linfocitos, fundamentalmente en los monocitos, son unas granulaciones de fuerte densidad electrónica, muy parecidos a los lisosomas por su pleomorfismo. En el torrente circulatorio los gránulos son muy escasos, y solo cuando se localizan en el tejido conectivo, dichas granulaciones aumentan en su número.

En esta fase los monocitos se comportan como células histiocitarias y de hecho se terminan trasformando en macrófagos. Esto indica que la mayor parte del contenido de los monocitos son enzimas hidrolíticas y son escasas las citocinas existentes, por este motivo en células sin tratar resulta mas positivo usar plaquetas ya que contienen gran cantidad de factores de crecimiento.

Pero los monocitos son unas células que se transforman al ser cultivadas, ya que aparecen como elementos hipertrofiados y con enormes cantidades de granulaciones, solo queda del monocito precursor su núcleo arriñonado. Son numerosas las imágenes de mitosis que se presentan y por este motivo existe una hiperplasia celular, aumentando drásticamente los nuevos monocitos granulados.

Pero sin duda alguna lo mas importante de esta transformación monocítica, es el fenómeno por el que cambian la síntesis de enzimas hidrolíticas por citoquinas, de acción similar a los factores de crecimiento del resto de cultivos de las células madres.

La complejidad de variación de citoquina que produce, se refleja en el fuerte pleomorfismo granular que presentan, destacándose un aumento en el tamaño y sobre todo un contenido heterogéneo que va desde cuerpo muy densos a sustancias de apenas densidad electrónica.

En definitiva una de la bondad de estos procesos, es concentrar abundantes citoquinas en zonas concretas y pequeñas.

El tipo de cultivo más utilizado. Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación y el crecimiento se detiene. Por eso, al cabo de un tiempo hay que transplantar las células a un nuevo soporte. Esta operación se denomina subcultivo o pase.

Las células del cultivo primario se dispersan por métodos enzimáticos y se pasan a un nuevo frasco de cultivo. En el caso de células en suspensión, sencillamente se diluyen en medio fresco. Los sucesivos cultivos así formados se denominan una línea celular. La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica que: aumenta el número de células obtenidas; acaban predominando uno o dos tipos celulares; los que tienen mayor tasa de crecimiento; la población celular se hace uniforme y homogénea; sus características se conservan durante las sucesivas generaciones y, si se conservan en nitrógeno líquido, de forma indefinida

Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su

capacidad de proliferar (supuestamente por el acortamiento de los telómeros) y mueren. Sin embargo, algunas células (como las de roedores y las tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente. Estas células pueden surgir de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida (infección vírica o transfección de ADN) y son el resultado de un cambio genotípico denominado transformación.

La primera limitación para el establecimiento de cultivos era lograr un medio nutritivo adecuado. Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo. Este medio se reveló mucho mejor que los anteriormente probados, lo que le permitió observar el crecimiento del tejido nervioso, corazón y piel.

Burrows y Carrel demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivos. Los medios empleados fueron plasma suplementado con extractos de embrión.

Rous y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular. Uno de los mayores problemas que describen para el establecimiento de los cultivos celulares es la aparición de múltiples contaminaciones, por lo que desarrollaron numerosos métodos de manipulación en condiciones de asepsia que aún hoy día se utilizan.

Al establecer un cultivo celular se seleccionan las células que van a crecer en función de numerosos criterios: sólo formarán parte del cultivo aquellas células que sean capaces de superar el proceso de disgregación, de adherirse al sustrato y de proliferar (bien en forma de monocapa, bien en suspensión).

El crecimiento en monocapa significa que las células se adherirán al sustrato y en esa forma inician la proliferación. Muchas líneas celulares son anclaje-dependientes, es decir, no inician la proliferación hasta que se han adherido al sustrato. Este es el modo normal de proliferación de la mayor parte de las células, con excepción de las células hematopoyéticas maduras.

El crecimiento en suspensión es propio de aquellas células capaces de proliferar sin necesidad de adherirse al sustrato porque son independientes del anclaje. Es propio de las células hematopoyéticas, algunas líneas celulares transformadas y de células procedentes de tumores. Es de destacar que en todo tejido existe una fracción o tipo celular que es capaz de crecer en suspensión. A pesar de que su origen no está claro se cree que se trata de células madre ("*stem cells*") indiferenciadas.

Cuando crecen en cultivo se establece una nueva selección: aumentan en número aquellas células que tienen una mayor tasa de crecimiento. Así pues, hay que considerar al cultivo como un ente dinámico en el que las proporciones relativas de los diferentes elementos que lo forman varían en el tiempo en función de la presión selectiva a que estén sometidos. En general, cuando se alcanza la confluencia, las

células detienen su crecimiento, aunque pueden existir tipos celulares neoplásicos que siguen duplicándose hasta desplazar a los otros tipos celulares del cultivo.

Al alcanzar la confluencia es cuando muchas líneas celulares expresan sus aspectos más característicos. Es en este estado cuando su morfología y fisiología son más parecidas a su estado original. Es también el momento en el que se detiene el crecimiento y se hace necesario dividir, replaquear o propagar las células.

La “apoptosis” es la muerte celular programada debido a una liberación de las endonucleasas. Las fibras musculares son células que sufren ese tipo de muerte celular en diversos procesos patológicos, entre los que se destacan las atrofas marcadas tras procesos de activación de dichos elementos celulares, como en el caso de tratamientos alternativos con β 2-agonistas (Apseloff, et al., 1993).

En el grupo tratado con monocitos, los mioblastos actuaron siguiendo dos patrones, en primer lugar, junto al aumento en el número de núcleos, los organoides que participaron en la síntesis de proteínas contráctiles se hicieron más evidentes, con un amplio desarrollo de las vesículas de transferencia. Este aumento de actividad llevó a que en esta primera fase comenzaran a producirse filamentos de miosinas y actina de forma indiscriminada. Y posteriormente los nuevos filamentos, en la segunda fase, se organizaron formando los sarcómeros de las miofibrillas. Como hemos observado en el grupo tratado con sustancias paracrinas, las células satélites que estaban en fase de activación, se mantuvieron dentro de la membrana basal de la fibra muscular asociándose con capilares, por una parte, aumentaron su metabolismo, y su posterior

reorganización se realizó paralelamente a las fibras que se mantuvieron, hasta formar nuevas fibras multinucleadas y contráctiles. En la actualidad no existen referencias relacionadas con el tratamiento paracrino tras la exposición al BPA, por lo que lo observado en nuestro estudio es muy novedoso, y hace pensar que este tipo de tratamientos se pudiera utilizar en casos de exposición crónica a sustancias estrogenizantes que generaran efectos severos, tal y cómo se viene utilizando en otras patologías.

Uno de los procesos que tuvo más importancia en la recuperación de las fibras musculares, fue el estado en que quedó el endomisio. De ahí que encontráramos importantes diferencias entre los grupos de recuperación sin tratamiento, sólo con la retirada del BPA, y el del posterior tratamiento paracrino tras la retirada del BPA. En el grupo de retirada, las fibras musculares adquirieron un aceptable grado de recuperación de las miofibrillas, como hemos descrito al estudiar los sarcomeros, lo mismo ocurrió en las fibras tratadas con factores paracrinos, por lo que en ambos casos se pudo considerar que las fibras habían recuperado su vitalidad y funcionamiento. Se observó como en el endomisio de las fibras sin tratamiento paracrino, se produjo una fuerte condensación de fibra de colágeno, en tanto que en las tratadas el colágeno fue casi inexistente, y sólo persistieron los capilares coincidiendo esto con lo observado por Giménez et al., 2016. Este fenómeno nos indicó que la recuperación en los casos de tratamiento con monocitos fue correcta tanto en la fibra como en el endomisio, en tanto que en el grupo de retirada, la fibra recuperó su funcionalidad, pero a nivel del endomisio, la aparición masiva de fibras de

colágeno, conllevaría a procesos de fibrosis, que harían que estos músculos fuesen propensos a posteriores roturas.

Desde el punto de vista de la eficacia, la medición de la misma se basa en la observación clínica de la favorable evolución del proceso. En varios casos en los que los fenómenos reparativos se encontraban ausentes o enlentecidos durante periodos muy prolongados de tiempo y en los que múltiples procedimientos reparativos habían fracasado, el empleo de forma concomitante ha resultado muy favorecedor obteniéndose curaciones tras simples procedimientos de aplicación. Desde el punto de vista del control del dolor y el sangrado, el seguimiento postoperatorio de estos pacientes también ha permitido establecer un adecuado efecto del citoquinas sobre estos parámetros.

Dentro de las alteraciones de las fibras musculares modificadas por un aumento de las miofibrillas se describe, en casos muy agudizados, una pérdida de la relación del continente y el contenido que lleva a mostrar formas atípicas y a veces monstruosas de estas fibras hipertrofiadas, Chen, et al., (2000). Y debido al gran tamaño que llegan a tener, estas fibras para favorecer su nutrición pueden incluso llegar a canalizarse, Maltin, et al., (1990). En los Tratados de Patología se cita que cada núcleo regula una porción concreta del citoplasma, por lo que cuando la célula en general se hipertrofia este aumento en su tamaño va acompañado por un aumento en el número de sus núcleos para dirigir los procesos metabólicos de las células hipertrofiadas, Kilt, et al., (1989). Esto ocurre en las fibras musculares tratadas con

bisfenol A, hasta el punto que para poder dirigir el metabolismo de las fibras hipertrofiadas no sólo aumentan el número de sus núcleos sino que también modifican su localización centralizando los componentes nucleares (Hayes, et al., 1997 y Lavoie, et al., 2002).

En conclusion, mediante la exposición al BPA, conseguimos establecer un modelo de degeneración de las fibras musculares, que sirviera de partida de tratamientos para su recuperación por activación de los mioblastos y de las propias fibras musculares. Pudimos observar cómo tras la retirada del BPA existió una recuperación parcial de las modificaciones histológicas aparecidas a nivel muscular. Por otro lado, el tratamiento con monocitos puso de manifiesto la capacidad regeneradora de estos compuestos sobre un músculo dañado tras la exposición a un xenoestrógeno.

7. Conclusiones

7. Conclusiones

Primera

Mediante la exposición al BPA en minipig, conseguimos establecer un modelo de necrosis y degeneración de las fibras musculares en los musculos *longissimus lumbaris* y *dorsis*, que sirve como biomodelo ideal de partida para el estudio de tratamientos con CMNs para evaluar su recuperación por activación de los mioblastos y de las propias fibras musculares.

Segunda

La acción del Bisfenol A sobre las fibras musculares en los músculos *longissimus lumbaris* y *dorsis* del cerdo minipig consiste en una hipertrofia de las fibras musculares por aumento del material contráctil, observándose este aumento del tamaño de las fibras.

Tercera

El Bisfenol A tiene una acción sobre la miofibrillas observándose mediante al microscopio electrónico miofibrillas dispuestas en arcadas, formando las degeneraciones en huellas dactilares pudiendo llegar incluso a mostrar canalizaciones del citoplasma.

Cuarta

La acción del BPA tiene sobre los músculos longissimus lumbaris y dorsis del cerdo minipig una acción reversible ya que los animales de retirada tras el tratamiento con BPA, así las fibras musculares adquieren un aceptable grado de recuperación de las miofibrillas, así como los sarcomeros, produciéndose por tanto una recuperación parcial de las modificaciones histológicas aparecidas a nivel muscular.

Quinta

Por acción del bisfenol A se produce una hipertrofia de los músculos longissimus lumbaris y dorsis del cerdo minipig, que a través del estudio morfométrico se demuestra que es debido a un aumento del material contráctil, con un aumento del diámetro de la fibra y un incremento del número de las distintas fibras: tipo I, tipo IIa,

tipo IIb y fibras alteradas. En los animales que se le retira el BPA, al igual que los tratados con CMNs muestran una evidente recuperación.

Sexta

Mientras que los factores de crecimiento plaquetario tienen su acción sobre los mioblastos, en tanto las sustancias paracrinas de los monocitos de medula, actúan indistintamente sobre los mioblastos y las fibras degeneradas.

Séptima

El uso de CMNs en animales previamente tratados con BPA muestran signos de recuperación. Este fenómeno nos indicó que la recuperación en los casos de tratamiento con monocitos fue correcta tanto en la fibra como en el endomisio. Sin embargo, la aparición masiva de fibras de colágeno, conllevaría a procesos de fibrosis, que harían que estos músculos fuesen propensos a posteriores roturas.

Octava

En el endomisio de las fibras musculares sin tratamiento paracrino, se produjo una fuerte condensación de fibra de colágeno, en tanto que en las tratadas con CMNs

Conclusiones

el colágeno es casi inexistente, y sólo persisten los capilares. La fibra recupera su funcionalidad, pero a nivel del endomisio, por tanto el tratamiento con monocitos pone de manifiesto la capacidad regeneradora de estos compuestos sobre un músculo dañado tras la exposición a un xenoestrógeno.

8. Resumen / Summary

8. Resumen / Summary

Resumen

El bisfenol-A (BPA) se ha descrito como un disruptor endocrino que perjudica la salud humana y animal. Como el BPA está presente en los alimentos y bebidas, debido a la lixiviación de los contenedores de policarbonato o latas de aluminio, los humanos están constantemente expuestos a él. Debido a la importancia para la salud pública de la exposición inconsciente al BPA, realizamos un estudio de su rápida acción sobre el tejido muscular y su posible tratamiento con monocitos de médula ósea. Para este propósito, 16 minipigs se distribuyeron aleatoriamente ($n = 4$) a uno de los siguientes grupos experimentales: el grupo de control tratado con BPA (durante 4 meses), el grupo de abstinencia de BPA (tratado durante 2 meses con BPA y dos meses sin), y el grupo de monocitos de médula ósea (MN) (tratado durante 2 meses con BPA, después de lo cual se retiró y el tratamiento con CMNs comenzó a durar 2 meses). Al final de los tratamientos, se realizó una biopsia de los músculos longissimus lumbaris (LL) y longissimus dorsi (LD). Las muestras fueron analizadas por microscopía óptica y electrónica. En nuestro estudio, se observó que después de la exposición continua al BPA aparecieron algunas alteraciones tanto en los músculos como en los colágenos de sus vainas. El grupo del que se retiró BPA durante dos meses exhibió una acción degenerativa reversible, con una recuperación parcial de los

músculos y del colágeno. En el último grupo de estudio, evaluamos la acción de los monocitos de la médula ósea sobre el tejido muscular modificado, y observamos que presentaban una notable acción de recuperación ya que prácticamente todas las alteraciones leves de músculo y colágeno que habían aparecido se revirtieron.

Palabras clave: Bisfenol-A, músculo, histopatología, colágeno, monocitos medulares

Summary

Bisphenol-A (BPA) has been described as an endocrine disruptor that impairs human and animal health. As BPA is present in food and drink, due to leaching from polycarbonate containers or aluminum cans, humans are constantly exposed to it. Due to the importance for public health of unconscious exposure to BPA, we conducted a study of its rapid action on muscle tissue and its possible treatment with bone marrow monocytes. For this purpose, 16 minipigs were randomly distributed ($n = 4$) to one of the following experimental groups: the control group treated with BPA (for 4 months), the BPA-withdrawal group (treated for 2 months with BPA and two months without), and the bone marrow monocytes (MN) group (treated for 2 months with BPA, after which it was withdrawn and CMNs treatment began lasting 2 months). At the end of the treatments, biopsy of the longissimus lumbaris (LL) and y longissimus dorsi (LD) was carried out. The samples were analysed by optical and electron microscopy. In our

study, it was observed that after continuous exposure to BPA some alterations appeared both in the muscle bres and in the collagen bres of their sheaths. The group from which BPA was withdrawn for two months exhibited a reversible degenerative action, with a partial recovery of both the muscle and the collagen bres. In the last study group, we evaluated the action of the bone marrow monocytes on the modi ed muscle tissue, and observed that they presented a notable recovery action since practically all the muscle and collagen bre alterations which had appeared were reversed.

Keywords: Bisphenol-A, muscle, histopathology, collagen, medular monocytes

9. Bibliografía

9. Bibliografía

- Abate, M., Shiavone, C. Salini, V. Andia, I. (2013). Occurrence of tendon pathologies in metabolic disorders. Review. Rheumatology 52(4):599-608
- Altamirano G. A., Muñoz-de-Toro M., Luque E. H., Gómez A. L., Delconte M. B. y Kass L. (2015). Milk lipid composition is modified by perinatal exposure to bisphenol A. Molecular and Cellular Endocrinology 411, 258-267.
- Andersen I. S., Lindeman L. C., Reiner A. H., Ostrup O., Aanes H., Aleström P. y Collas P. (2013). Epigenetic marking of the zebrafish developmental program. Current Topics in Developmental Biology 104, 85-112.
- Andia I, Sanchez M, Maffulli N. Tendon healing and platelet-rich plasma therapies (2010). Expert Opin Biol Ther. 10(10):1415-26.

- Andra S. S, Austin C., Yang J., Patel D., y Arora M. (2016). Recent advances in simultaneous analysis of bisphenol A and its conjugates in human matrices: Exposure biomarker perspectives. *Science of the Environment* 572, 770-781.
- Andra S. S., Charisiadis P., Arora M., van Vliet-Ostapchuk J. V. y Makris K. C. (2015). Biomonitoring of human exposures to chlorinated derivatives and structural analogs of bisphenol A. *Environment International* 85, 352-379.
- Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT.(2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost.* 91(1):4-15.
- Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Zalduendo M, de la Fuente M, Orive G, Azofra J, Andia I. (2016) Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J Biomed Mater Res A*;77(2):285-93.
- Anitua E, Sanchez M, Orive G, Andia I. (2009) Shedding light in the controversial terminology for platelet rich products. *J Biomed Mater Res A*. 15;90(4): 1262-3.
- Anitua E, Sanchez M, Merayo-Llodes J, De la Fuente M, Muruzabal F, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival fibroblasts and inhibits and reverts TGF-beta1-Induced myodifferentiation.(2011) *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1; 52(9):6066-73.
- Ankley G. T. y Johnson R. D. (2016). Small fish models for identifying and assessing the Effects of Endocrine-disrupting chemicals. *ILAR journal* 57, 469-483.

- ANSES (20/06/2016). Recuperada 22 de junio, 2017 de <https://www.anses.fr/en/content/bisphenol>

- Aspenberg P, Virchenko O. Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats.(2004) *Acta Orthop Scand*.75(1):93-9.

- Balakrishnan B., Henare K., Thorstensen E. B., Ponnampalam A. P. y Mitchell M. D. (2010). Transfer of bisphenol A across the human placenta. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 202, 393.

- Barasona M, Molina A, Blanco A, Ayala N, Moyano R. (2017). Assessment of the effects of bisphenol-A as a disruptor on ionic regulation in zebrafish through a study of their chloride and prolactin cells. *Acta Adriatica* 58(1)

- Berkner S., Streck G. y Hermann R. (2004). Development and validation of a method for determination of trace levels of alkylphenols and bisphenol A in atmospheric samples. *Chemosphere* 54, 575-584.

- Bosch G, van Schie HT, de Groot MW, Cadby JA, van de Lest CH, Barneveld A, van Weeren PR. Effects of platelet-rich plasma on the quality of repair of mechanically induced core lesions in equine superficial digital flexor tendons: a placebocontrolled experimental study.(2010). *J Orthop Res.* 28(2):211-7.

- Braun J.M y Hauser R. (2011). Bisphenol A and children's health. *Current opinion in pediatrics* 23, 233-239.

- Brion F., Page Y. L., Piccini B., Cardoso O., Tong S. K., Chung B. y Kah O. (2012). Screening Estrogenic Activities of Chemicals or Mixtures in vivo using Transgenic (cyp19a1b-GFP) Zebrafish Embryos. *PLoS ONE* 7(5): e36069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036069>

- Blanco, A. Moyano, R. Molina, A, Blanco, C. Flores-Acuña, R. García-Flores, R. Espada, M, Monterde JG (2009): Quantitative study of Leydig cell populations in mice exposed to low doses of cadmium. *Bull Environ Contam Toxicol* 82, 756-760
- Blanco, A. Moyano, R. Vivo, J. Molina, A, Flores-Acuña, R Agüera E. (2007): Quantitative changes in the testicular structure in mice exposed to low doses of cadmium. *Environ Tox Pharm* 23, 96-101
- Calafat A. M., Kuklenyik Z., Reidy J. A., Caudill S. P. y Needham L. L. (2005). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environmental Health Perspective* 113, 391-395.
- Calafat A. M., Longnecker M. P., Koch H. M., Swan S. H., Hauser R., Goldman L. R., Lanphear B. P., Rudel R. A., Engel S. M., Teitelbaum S. L., Whyatt R. M. y Wolff M. S. (2015). Optimal exposure biomarkers for nonpersistent chemicals in environmental epidemiology. *Environmental Health Perspective* 123, 166-168.
- Calafat A. M., Ye X. Y., Wong L. Y., Reidy J. A. y Needham L. L. (2008). Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environmental Health Perspective* 116, 39-44.
- Canesi L & Fabbri E. Environmental effects of BPA: Focus on aquatic species. 2015. Environmental effects of BPA: Focus on aquatic species. Dose-response: An international journal july-september 1-14
- Cantonwine D., Meeker J. D., Hu H., Sánchez B. N., Lamadrid-Figueroa H., Mercado-García A., Fortenberry G. Z., Calafat A. M. y Téllez-Rojo M. M. (2010). Bisphenol A exposure in Mexico City and risk of prematurity: a pilot nested case control study. *Environmental Health* 9, 62.
- Cao N., Wei H., Wu L. G., Wu T. T. y Li G. P. (2010). Effects of bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*) liver and gonad. *Chin. J. Ecol.* 29, 2129-2198.

- Carnevali O., Notarstefano V., Olivotto I., Graziano M., Gallo P., Di Marco Pisciotto I., Vaccari L., Mandich A., Giorgini E. y Maradonna F. (2017). Aquatic Toxicology 185, 95-104.

- Casalechi HL, Nicolau RA, Casalechi VL, Silveira L Jr, De Paula AM, Pacheco MT. The effects of low-level light emitting diode on the repair process of Achilles tendon therapy in rats. Lasers Med Sci. 2009 Jul;24(4):659-65. Epub 2008 Sep 16.

- Castricini R, Longo UG, De Benedetto M, Panfoli N, Pirani P, Zini R, Maffulli N, Denaro V. Platelet-rich plasma augmentation for arthroscopic rotator cuff repair: a randomized controlled trial. Am J Sports Med. 2011 Feb;39(2):258-65. Epub 2010 Dec 15.

- Cheschenko K., Pakdel F., Segner H., Kah O. y Eggen R. (2008). Interference of endocrine disrupting chemicals with aromatase CYP19 expression or activity, and consequences for reproduction of teleost fish. General and Comparative Endocrinology 155, 31-62.

- CHOI, K., E. JEUNG (2003): The biomarker and endocrine disruptors in mammals. J. Reprod. Dev.49, 337-345

- Chung E., Genco M. C., Megrelis L. y Ruderman J. V. (2011). Effects of bisphenol A and triclocarban on brain-specific expression of aromatase in early zebrafish embryos. Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A. 108, 17732-17737.

- Corrales J., Kristofco L. A., Steele W. B., Yates B. S., Breed C. S., Williams E. S. y Brooks B. W. (2015). Global Assessment of Bisphenol A in the Environment: Review and Analysis of Its Occurrence and Bioaccumulation. Dose-Response. doi: 10.1177/1559325815598308.

- CUNHA, R.C., J.C. FRANCISCO, M.A. CARDOSO, M.A. MATOS, L.F. MATOS, D. LINO, R.B. SIMEONI, G. PEREIRA, A.C. IROIDA, P.R. SIMEONI, L.C. GUANITA-

- SOUZA, K.A. CARVALHO (2014): Effect of platelet rich plasma therapy associated with exercise training in musculoskeletal healing in rats. *Transplant Proc* 46, 1879-81.
- Diamanti –Kandarakis E., Bourguignon J. P., Giudice L. C., Hauser R., Prins G. S., Soto A. M., Zoeller R. T. y Gore A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocrine reviews* 30, 293-342.
 - Directiva 2002/72/CE de la Comisión, relativa a los materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con productos alimenticios (2002).
 - Directiva 2011/8/UE de la Comisión, que modifica la Directiva 2002/72/CE por lo que se refiere a la restricción del uso de bisfenol A en biberones de plástico para lactantes (2011).
 - Dohan Ehrenfest DM, Rasmusson L, Albrektsson T. Classification of platelet concentrates: from pure platelet-rich plasma (P-PRP) to leucocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Trends Biotechnol.* 2009 Mar;27(3):158-67. Epub 2009 Jan 31.
 - Douillard, A.O. Galbes, B. Rossano, B. Mermus, A. Bonnieu, R. Candau (2011): Time course in calpain activity and autolysis in slow and fast skeletal muscle during clenbuterol treatment. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 89, 117-25.
 - Ehrlich S., Williams P. L., Missmer S. A., Flaws J. A., Ye X., Calafat A. M., Petrozza J. C., Wright D. Y Hausser R. (2012). Urinary bisphenol A concentrations and early reproductive health outcomes among women undergoing IVF. *Hum. Reprod.* 27, 3583-3592.
 - ECHA (16 de Junio, 2017). MSC unanimously agrees that Bisphenol A is an endocrine disruptor. Recuperado de <https://echa.europa.eu/es/-/msc-unanimously-agrees-that-bisphenol-a-is-an-endocrine-disruptor>.
 - EFSA 2015, Scientific opinion on the risk to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuff.

- Engebretsen L, Steffen K, Alsousou J, Anitua E, Bachl N, Devilee R, Everts P, Hamilton B, Huard J, Jenoure P, Kelberine F, Kon E, Maffulli N, Matheson G, Meidan O, Menetrey J, Philippon M, Randelli P, Schamasch P, Schwellnus M, Vernec A, Verrall G. IOC consensus paper on the use of platelet-rich plasma in sports medicine. *Br J Sports Med.* 2010 Dec;44(15):1072-81.

- Evenset A., Hallanger I. G., Tessmann M., Warmes N., Ruus A., Borgä K., Gabrielsen G. W., Christensen G. y Renaud P. E. (2016). Seasonal variation in accumulation of persistent organic pollutants in an Arctic marine benthic food web. *Science of The Total Environment* 542, 108-120.

- Fang X., Dong W., Thornton C. y Willett K. L. (2010). Benzo[a]pyrene effects on glycine N-methyltransferase mRNA expression and enzyme activity in *Fundulus heteroclitus* embryos. *Aquatic Toxicology.* 98, 130-138.

- Fang X., Thornton C., Scheffler B. E. y Willet K. L. (2013). Benzo[a]pyrene decreases global and gene specific DNA methylation during zebrafish development. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36, 40-50.

- Fenwick SA, Hazleman BL, Riley GP. The vasculature and its role in the damaged and healing tendon. *Arthritis Res.* 2002;4(4):252-60. Epub 2002 Feb 13.

- Ferguson K. K., McElrath T. F., Cantonwine D. E., Mukherjee B. y Meeker J. D. (2015). Phtalate metabolites and bisphenol-A in association with circulating angiogenic biomarkers across pregnancy. *Placenta* 36, 699-703.

- Ferguson S.A., Law C.D. y Abshire J.S. (2012). Developmental treatment with bisphenol A causes few alterations on measures of postweaning activity and learning. *Neurotoxicology and Teratology* 34, 598-606.

- Filardo G, Kon E, Della Villa S, Vincentelli F, Fornasari PM, Marcacci M. Use of platelet-rich plasma for the treatment of refractory jumper's knee. *Int Orthop.* 2010 Aug;34(6):909-15. Epub 2009 Jul 31.

- Flint S., Markle T., Thompson S. y Wallace E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: a wildlife perspective. *Journal of environmental management* 104, 19-34.
- Fu P. Q., Kawamura K., Pavuluri C. M., Swaminathan T. y Chen J. (2010). Molecular characterization of urban organic aerosol in tropical India: contributions of primary emissions and secondary photooxidation. *Atmospheric Chemistry and Physics* 10, 2663-2689.
- GAO, X., L. YU, L. CASTRO, A. MOORE, T. HERMON, C. BORTNER, M. SIFRE, D. DIXON (2010): An endocrine-disrupting chemical, fenvalerate, induces cell cycle progression and collagen type I expression in human uterine leiomyoma and myometrial cells. *Toxicol.Lett.* 196, 133-141.
- Gaweda K, Tarczyska M, Krzyzanowski W. Treatment of Achilles tendinopathy with platelet-rich plasma. *Int J Sports Med.* 2010 Aug;31(8):577-83. Epub 2010 Jun 9.
- Gaweda K., M. Tarczyska, W. Krzyzanowski (2010): Treatment of Achilles tendinopathy with platelet-rich plasma. *Int J Sports Med.* 31, 577-83.
- Geens T., Aerts D., Berthot C., Bourguignon J.P., Goeyens L., Lecomte P., Maghuin-Rogister G., Pironnet A. M., Pussemier L., Scippo M. L. y Covaci A. (2012). A review of dietary and non-dietary exposure to bisphenol-A. *Food and chemical toxicology* 50, 3725-3740.
- Geens T., Goeyens L. y Covaci A. (2011). Are potential sources for human exposure to bisphenol-A overlooked?. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 214, 339-347.
- Gerona R. R., Woodruff T. J., Dickennson C. A., Pan J., Schwartz J. M., Sen S., Friesen M. W., Fujimoto V. Y. y Hunt P. A. (2013). Bisphenol A (BPA), BPA glucuronide, and BPA sulfate in midgestion umbilical cord serum in a northern and

central California population. *Environmental Science and Technology* 47, 12477-1248.

- Giménez, M., A. Molina, A. Blanco, M. Ayala, R. Moyano (2016): Structural and ultrastructural evaluation of fibre muscles after exposure to Bisphenol-A, and a study of their possible recovery after treatment with platelet-rich plasma. *Veterinarski Arhiv* 86, 49-64
- Giulivo M., Lopez de Alba M., Capri E. y Barceló D. (2016). Human exposure to endocrine disrupting compound: Their role in reproducing systems, metabolic syndrome and breast cancer. A review. *Environmental review* 151, 251-264.
- Graselli, F., L. Baratta, L. Baioni, S. Bussolati, R. Ramoni, S. Grolli, G. Basini (2010): Bisphenol A disrupts granulosa cell function. *Domestic Animal Endocrinology* 39, 34-39.
- Hauck Z. Z., Huang K., Li G. y van Breemen R. B. (2016). Determination of bisphenol A-glucuronide in human urine using ultrahigh-pressure liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 30, 400-406.
- HATEF, A., S. M. HADI ALAVI, A. ABDULFATAH, P. FONTAINE, M. RODINA, O. LINHERT (2012): Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. *Ecotox. Environ. Safe.* 76, 56-62.
- Hope M, Saxby TS. Tendon healing. *Foot Ankle Clin.* 2007 Dec;12(4):553-67, v.
- Hsu, C., J. Chang (2004): Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am.* 29, 551-63.

- HUANG, H., N. SILLANCE (2000): Differential effect of dexamethasone and clenbuterol on rat growth and on beta 2-adrenoceptors in lung and skeletal muscle. *J Anim Sci* 78,604-608
- IARC, IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks, Volumen 71 (1999).
- Ikezuki Y., Tsutsumi O., Takai Y., Kamei Y. y Taketani Y. (2002). Determination of bisphenol A concentrations in human biological fluids reveals significant early prenatal exposure. *Human Reproduction* 17, 2839-2841.
- Inoue H., Kemanai S., Sano C., Kato S., Yokota H. y Iwano H. (2016). Bisphenol A glucuronide/sulfate diconjugate in perfused liver of rats. *Journal of Veterinary Medical Science* 78, 733-737.
- INDUMATHI, D., S. JAYASHREE, J. SELVARAJ, C. MAVILVANAN, N. AKILAVALLI, K. BALASUBRAMANIAN (2013): Effect of bisphenol A on insulin signal transduction and glucose oxidation in skeletal muscle of adult male albino rat. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 960-71.
- Jasarevic E., Williams S. A., Vandas G. M., Ellersieck M. R., Liao C., Kannan K., Roberts R. M., Geary D.C. y Rosenfeld C. S. (2013). Sex and dose-dependent effects of developmental exposure to bisphenol A on anxiety and spatial learning in deer mice (*Peromyscus maniculatus bairdii*) offspring. *Hormones and Behavior* 63, 180-189.
- Jeffery, T.L., A.R. Jeffrey (1991): Anabolic steroid-induced tendon pathology: a review of the literature. *Clinical Sciences. Clinical review*, 23 (1):1-3
- Johnson G.E. y Parry E.M. (2008). Mechanistic investigations of low dose exposures to the genotoxic compounds bisphenol-A and rotenone. *Mutation Research* 651, 56-63.

- Juan-Garcia A., Gallego C. y Font G. (2015). Toxicidad del Bisfenol. *Rev. Toxicol* 32, 144-160.
- Kader D, Saxena A, Movin T, Maffulli N. Achilles tendinopathy: some aspects of basic science and clinical management. *Br J Sports Med*. 2002 Aug;36(4): 239-49.
- Hou Y, Mao Z, Wei X, Lin L, Chen L, Wang H, Fu X, Zhang J, Yu C. Effects of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor 165 gene transfer on Achilles tendon healing. *Matrix Biol*. 2009 Jul;28(6):324-35. Epub 2009 Apr 21.
- Hsu C, Chang J. Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg Am*. 2004 Jul;29(4):551-63.
- Kabir E. R., Rahman M. R. y Rahman I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40, 241-258.
- Kallivretaji E., Eggen R., Neuhauss S., Alberti M., Kaush U. y Segner H. (2006). Aromatase in zebrafish: A potential target for endocrine disrupting chemicals. *Marine Environmental Research* 62, 187-190.
- Kazeko Y., Place A. R. y Trant J. M. (2004). Effects of endocrine disrupting chemicals on the expression of CYP19 genes in zebrafish 8Danio rerio) juveniles. *Aquatic Toxicology* 69, 25-34.
- Kon E, Filardo G, Di Martino A, Marcacci M. Platelet-rich plasma (PRP) to treat sports injuries: evidence to support its use. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2011 Apr;19(4):516-27. Epub 2010 Nov 17.

- Kurebayashi, H., Okudaira, K. y Ohno, Y. (2010). Species difference of metabolic clearance of bisphenol A using cryopreserved hepatocytes from rats, monkeys and humans. *Toxicology Letters*. 198, 210–215.
- Lang I.A., Galloway T.S., Scarlett A., Henley W. E., Depledge M., Wallace R.B. y Melzer D. (2008). Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *Jama-Journal of the American Medical Association* 300, 1303-1310.
- Le Fol V., Aït-Aïssa S., Sonavane M., Porcher J.M., Balaguer P., Cravedi J. P., Zalko D. y Brion F. (2017). In vitro and in vivo estrogenic activity of BPA, BPF and BPS in zebrafish-specific assays. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 142, 150-156.
- Lee C-C., Jiang L-Y., Kuo Y-L., Hsieh C. Y., Chen C. y Tien C. J. (2013). The potential role of water quality parameters on occurrence of nonylphenol and bisphenol A and identification of their discharge sources in the river ecosystems. *Chemosphere* 91, 904-911.
- Lee S. G., Kim J. K., Chung J. Y., Kim Y. J., Park J. E., Oh S., Yoon Y. D., Yoo K. S., Yoo Y. H. y Kim J. M. (2013). Bisphenol A Exposure during Adulthood Causes Augmentation of Follicular Atresia and Luteal Regression by Decreasing 17 β -Estradiol Synthesis via Downregulation of Aromatase in Rat Ovary. *Environmental Health Perspectives*; DOI:10.1289/ehp.1205823.
- Lee M. R., Park H., Bae S., Lim Y. H., Kim J. H., Cho S. H. y Hong Y. C. (2014). Urinary bisphenol A concentrations are associated with abnormal liver function in elderly: a repeated panel study. *Journal of Epidemiology & Community Health* 68, 312-317.
- Liao C. y Kannan K. (2012). Determination of free and conjugates forms of bisphenol A in human urine and serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environmental Science and Technology* 46, 5003-5009.

- Lindholm C., Pedersen S. N. y Bjerregaard P. (2001). Uptake, metabolism and excretion of bisphenol A in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology* 55, 75-84.

- LÓPEZ-CASAS, P., S.C. MIZRAK, L.A. LÓPEZ-FERNÁNDEZ, M. PAZ, D.G. DE ROOIJ, J. DEL MAZO (2012): The effects of different endocrine disruptors defining compound-specific alterations of gene expression profiles in the developing testis. *Reproductive Toxicology* 33, 106-115.

- Lora A. J., Molina A. M., Bellido C., Blanco A., Monterde J. G. y Moyano M. R. (2016). Adverse effects of bisphenol A on the testicular parenchyma of zebrafish revealed using histomorphological methods. *Veterinari Medicine* 61, 577-589.

- Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Polychronidis A, Tryfonidis M, Botaitis S, Agrogiannis G, Simopoulos C, Kokka A, Patsouris E. The influence of platelet-rich plasma on angiogenesis during the early phase of tendon healing. *Foot Ankle Int.* 2009 Nov;30(11):1101-6.

- Lyras DN, Kazakos K, Tryfonidis M, Agrogiannis G, Botaitis S, Kokka A, Drosos G, Tilkeridis K, Verettas D. Temporal and spatial expression of TGF-beta1 in an Achilles tendon section model after application of platelet-rich plasma. *Foot Ankle Surg.* 2010 Sep;16(3):137-41. Epub 2009 Nov 12.

- Maffulli N, Moller HD, Evans CH. Tendon healing: can it be optimised? *Br J Sports Med.* 2002 Oct;36(5):315-6.

- Maia J., Cruz J., Sendón R., Bustos J., Sanchez J. y Paseiro P. (2009). Effect of detergents in the release of bisphenol A from polycarbonate baby bottles. *Food Research international* 42, 1410-1414.

- Mandich A., Bottero A., Benfenati E., Cevasco E., Erratico C., Maggioni S., Massari A., Pedemonte F. y Viganò L. (2007). In vivo exposure of carp to graded

- concentrations of bisphenol A. *General and Comparative Endocrinology* 153, 15-24.
- Marococcia D., Pellegrini M., Fiocchetti M., Lorenzetti M. y Marino. M. (2017). Food components and contaminants as (anti)androgenic molecules. *Genes & Nutrition* 12:6. DOI: 10.1186/s12263-017-0555-5
 - Mathieu-Denoncourt J., Wallace A.J., de Solla S. R. y Langlois V. S. (2016). Influence of Lipophilicity on the Toxicity of Bisphenol A and Phtalates to Aquatic Organisms. *Bulletin Environmental Contamination and Toxicology* 97, 4-10.
 - Matsumoto H., Adachi S. y Suzuki Y. (2005). Bisphenol A in ambient air particulates responsible for the proliferation of MCF-7 human breast cancer cells and its concentration changes over 6 months. *Archives Environmental Contamination and Toxicology* 48, 459-466.
 - Mercea P. (2009). Physicochemical processes involved in migration of bisphenol A from polycarbonate. *Journal of Applied Polymer Science* 112,579-593.
 - Merchant Research & Consulting Ltd (n.f.). Recuperada 31 de Mayo 2017 de <https://mcgroup.co.uk/news/20131108/bpa-production-grew-372000-tonnes.html>.
 - Michalowicz J. (2014). Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental toxicology and pharmacology* 37, 738-758.
 - Mileva G., Baker S. L., Konkle A. y Bielajew C. (2014). Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *International journal of environmental research and public health* 11, 7537-7561.
 - Molina A. M., Lora A. J., Blanco A., Monterde J. G., Ayala N. y Moyano R. (2013). Endocrine-active compound evaluation: Qualitative and quantitative

histomorphological assessment of zebrafish gonads after bisphenol-A exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 88, 155-162.

- Molloy T, Wang Y, Murrell G. The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med.* 2003;33(5):381-94.
- Mortavazi, S, A.R. Bakhtiari, A.E. Sari, N. Bahramifar, F. Rahbarizadeh (2013): Occurrence of endocrine disruption chemicals (Bisphenol A, 4-Nonyphenol, and Octylphenol) in muscle and liver of, *Cyprinus Carpio* Common, from Anzali Wetland, Iran. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 90, 578-584
- Mishra A, Pavelko T. Treatment of chronic elbow tendinosis with buffered platelet-rich plasma. *Am J Sports Med.* 2006 Nov;34(11):1774-8. Epub 2006 May 30.
- Muhamad M. S., Salim M. R., Lau W. J. y Yusop Z. (2016). A review on bisphenol A occurrences, health effects and treatment process via membrane technology for drinking water. *Environmental Science Pollution Res* 23, 11549-11567.
- Munguia-Lopez E., Gerardo-Lugo S., Peralta E., Bolumen S. y Soto-Valdez H. (2005). Migration of bisphenol A (BPA) from can coatings into fatty-food simulant and tuna fish. *Food Additives & Contaminants* 22, 892-8987.
- Murray MM, Spindler KP, Ballard P, Welch TP, Zurakowski D, Nanney LB. Enhanced histologic repair in a central wound in the anterior cruciate ligament with a collagen-platelet-rich plasma scaffold. *J Orthop Res.* 2007 Aug;25(8):1007-17.
- Nam S. H., Seo Y.M. y Kim M. G., (2010). Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use. *Chemosphere* 79, 949-952.

- Niu Y., Zhang J., Wu Y. y Shao B. (2012). Analysis of bisphenol A and Alkylphenols in cereals by automates on-line solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 60, 6116-6122.
- OECD, 2009. OECD Guidance Document for the Diagnosis of Endocrine-Related Histopathology of Fish Gonads.
- OMS, 2002. Global assesement of the state-of-the-science of endocrine disrutors.
- Omeroglu S, Peker T, T ~ urk ~ ozkan N, Omeroglu H. High-dose vitamin C supple-
~ mentation accelerates the Achilles tendon healing in healthy rats. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2009 Feb;129(2):281-6. Epub 2008 Feb 29.
- Orden PRE/628/2011, por la que se modifica el Anexo II del Real Decreto 866/2008, de 23 de mayo, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo (2011).
- Paoloni J, De Vos RJ, Hamilton B, Murrell GA, Orchard J. Platelet-rich plasma treatment for ligament and tendon injuries. *Clin J Sport Med.* 2011 Jan;21(1):37-45.
- Patrignani, N., A. Molina, A. Blanco, M. Ayala, R. Moyano (2014): Structural and ultrastructural evaluations of zebrafish ovaries after exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Acta Adriat* 54, 3-12
- Peerbooms JC, Sluimer J, Bruijn DJ, Gosens T. Positive effect of an autologous platelet concentrate in lateral epicondylitis in a double-blind randomized controlled trial: platelet-rich plasma versus corticosteroid injection with a 1-year follow-up. *Am J Sports Med.* 2010 Feb;38(2):255-62.

-
- Provencher G., Bérubé R., Dumas P., Bienvenu J. F., Gaudreau E., Bélanger P. y Ayotte P. (2014). *Journal of Chromatography A* 1348, 97-104.
 - Pellegrino, M. A. D'Antona, G. Bortolotto, F. Boschi, O. Pastoris, R. Botinelli B., Polla, C. (2004): Clenbuterol antagonizes glucocorticoid-induced atrophy and fibre type transformation in mice. *Exp. Physiol.* 89, 89-100.
 - Querat B., Sellouk A. y Salmon C. (2000). Phylogenetic analysis of the vertebrate glycoprotein hormone family including new sequences of sturgeon (*Acipenser baeri*) beta subunits of the two gonadotropins and the thyroid-stimulating hormone. *Biology and Reproduction* 63, 222-228.
 - Randelli PS, Arrigoni P, Cabitza P, Volpi P, Maffulli N. Autologous platelet rich plasma for arthroscopic rotator cuff repair. A pilot study. *Disabil Rehabil.* 2008; 30(20-22):1584-9.
 - Rochester, J.R. (2013): Bisphenol A and human health: a review of the literature. *Reprod. Toxicol.* 42, 132-155
 - Real Decreto 866/2008, por el que se aprueba la lista de sustancias permitidas para la fabricación de materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con los alimentos y se regulan determinadas condiciones de ensayo (2008).
 - Rocha S., Domingues V., Pinho C., Fernandes V., Delerue-Matos C., Gameiro P. y Mansilha C. (2013). Occurrence of bisphenol A, estrone, 17 β -estradiol and 17 α -ethinylestradiol in Portuguese Rivers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 90,73-78.
 - RODRÍGUEZ, H.A., N. SANTAMBROSIO, C.G. SANTAMARÍA, M. MUÑOZ-DE-TORO, E.H. LUQUE (2010): Neonatal exposure to bisphenol A reduces the pool of primordial follicles in the rat ovary. *Reprod Toxicol* 30, 550-517.

- Salgueiro-González, N., Turnes-Carou I., Viñas L., Besada V., Muniategui-Lorenzo S., López-Mahía P. y Prada-Rodríguez D. (2016). Occurrence of alkylphenols and bisphenol A in wild mussel samples from the Spanish Atlantic coast and Bay of Biscay, Marine Pollution Bulletin, <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.03.003>
- Saili K. S., Corvi M. M., Weber D. N., Patel A. U., Das S. R., Przybyla J., Anderdon K. A. y Tanguay R. L. (2012). Neurodevelopmental low-dos bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish. *Toxicology* 294, 83-92.
- Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andúrga I, Padilla S, Mujika I. Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med.* 2007 Feb;35(2):245-51. Epub 2006 Nov 12.
- Sarrafian TL, Wang H, Hackett ES, Yao JQ, Shih MS, Ramsay HL, Turner AS. Comparison of Achilles tendon repair techniques in a sheep model using a crosslinked acellular porcine dermal patch and platelet-rich plasma fibrin matrix for augmentation. *J Foot Ankle Surg.* 2010 Mar-Apr;49(2):128-34. Epub 2010 Feb 4.
- Segner H. (2009). Zebrafish (*Danio rerio*) as a model organism for investigating endocrine disruption. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 149, 187-195.
- Sharma P, Maffulli N. Tendon injury and tendinopathy: healing and repair. *J Bone Joint Surg Am.* 2005 Jan;87(1):187-202.
- Schepull T, Kvist J, Norrman H, Trinks M, Berlin G, Aspenberg P. Autologous platelets have no effect on the healing of human achilles tendon ruptures: a randomized single-blind study. *Am J Sports Med.* 2011 Jan;39(1):38-47. Epub 2010 Nov 3.
- Schnabel LV, Mohammed HO, Miller BJ, McDermott WG, Jacobson MS, Santangelo KS, Fortier LA. Platelet rich plasma (PRP) enhances anabolic gene

expression patterns in flexor digitorum superficialis tendons. J Orthop Res. 2007 Feb;25(2):230-40.

- Shao B., Han H., Li D., Ma Y., Tu X. y Wu Y. (2007). Analysis of alkylphenol and bisphenol A in meat by accelerated solvent extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Food Chemistry 105, 1236-1241.
- Skerry TM, Lanyon LE. Immobilisation induced bone loss in the sheep is not modulated by calcitonin treatment. Bone. 1993 May-Jun;14(3):511-6.
- Skerry TM, Lanyon LE. Interruption of disuse by short duration walking exercise does not prevent bone loss in the sheep calcaneus. Bone. 1995 Feb;16(2):269-74.
- Stachel B., Ehrhorn u., Heemken O., Lepom P., Reinckle H., Sawal G. y Theobald N. (2003). Xenoestrogens in the River Elbe and its tributaries. Environmental Pollution 124, 497-504.
- Stromqvist M., Tooke N. y Brunstrom B. (2010). DNA methylation levels in the 5' flanking region of the vitellogenin I gene in liver and brain of adult zebrafish (Danio rerio) sex and tissue differences and effects of 17alpha-ethinylestradiol exposure. Aquatic Toxicology. 98, 275-281.
- Takao Y., Lee H. C., Kohra S. y Arizono K. (2002). Release of bisphenol A from food can lining upon heating. Journal of Health Science 48, 331-334.
- Tang R., Chen M. J., Ding G. D., Chen X. J., Han X. M., Zhou K., Chen L. M., Xia L. M., Tian Y. y Wang X. R. (2013). Associations of prenatal exposure to phenols with birth outcomes. Environmental Pollution. 178, 115-120.
- Vandenberg L. N., Hauser R., Marcus M., Olea N. y Welshons W. V. (2007). Human exposure to bisphenol A (BPA). Reproductive toxicology 24, 139-177.

- Vandenberg, L.N., S. Ehrlich, S.M. Belcher, N. Ben-Jonathan, D.C. Dolinoy, P.A. Hugo, R.R. Newbold, B.S. Rubin, K.S. Saili, A. Soto, H. WANG, F.S. Vom Saal (2013): Low dose effects of bisphenol A: An integrated review of in vitro, laboratory, animal, and epidemiology studies. *Endocrine disruptors*. E26490
- VandeVoort C., Gerona R. R., vom Saal F. S., Tarantal A., Hunt P. A., Hillenweck A. y Zalko D. (2016). Maternal and fetal Pharmacokinetics of Oral Radiolabeled and Authentic Bisphenol A in the Rhesus Monkey. *PLoS One* 11: e0165410.
- Virchenko O, Aspenberg P. How can one platelet injection after tendon injury lead to a stronger tendon after 4 weeks? Interplay between early regeneration and mechanical stimulation. *Acta Orthop*. 2006 Oct;77(5):806-12.
- Virchenko O, Grenegård M, Aspenberg P. Independent and additive stimulation of tendon repair by thrombin and platelets. *Acta Orthop*. 2006 Dec;77(6): 960-6.
- Vökel W., Colnot T., Csanády G. A., Filser J. G. y Dekant W. (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chemical research in toxicology* 15, 1281-1287.
- Volkel W., Bittner N. y Dekant W. (2005). Quantification of bisphenol A and bisphenol A glucuronide in biological samples by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* 33, 1748-1757.
- Volberg V., Harley K., Calafat A. M., Dave V., McFadden J., Eskenazi B. y Holland N. (2013). Maternal bisphenol A exposure during pregnancy and its association with adipokines in Mexican-American children. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 54, 621-628.

- Vos de RJ, Weir A, van Schie HT, Bierma-Zeinstra SM, Verhaar JA, Weinans H, Tol JL. Platelet-rich plasma injection for chronic Achilles tendinopathy: a randomized controlled trial. *JAMA*. 2010 Jan 13;303(2):144-9.
- Vos de RJ, Weir A, Tol JL, Verhaar JA, Weinans H, van Schie HT. No effects of PRP on ultrasonographic tendon structure and neovascularisation in chronic midportion Achilles tendinopathy. *Br J Sports Med*. 2011 Apr;45(5):387-92. Epub 2010 Nov 3.
- Wang, X., Q. Don, Y. Chen, H. Jiang, Q. Xiao, Y. Wang (2013): Bisphenol A affects axonal growth, musculature and motor behavior in developing zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 142-143, 104-113
- WANG, X., Q. DONG, Y. CHEN, H. JIANG, Q. XIAO, Y. WANG, W. LI, C. BAI, C. HUANG, D. YANG, (2013): Bisphenol A affects axonal growth, musculature and motor behaviour in developing zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 142, 104-113
- Weber D. N., Hoffmann R. G., Hoke E. S. y Tanguay R. L. (2015). Bisphenol A exposure during early development induces sex-specific changes in adult zebrafish social interactions. *Journal of Toxicology and Environmental Health Part A* 78, 50-66.
- Yang, X., Liu, J., Li, M., Chen, D. Peng, Y. Liang, M., Song, J., Zhang, G. Jiang, G (2014): Exposure to Bisphenol AF Disrupts Sex Hormone Levels and Vitellogenin Expression in Zebrafish. *Environmental Toxicology* DOI 10.1002/tox
- Yang J. y Chang K. M. (2015). Evaluation of the toxic effects of brominated compounds (BDE-47, 99, 209, TBBPA) and bisphenol A (BPA) using zebrafish liver cell line, ZFL. *Aquatic Toxicology* 159, 138-147.
- Yoshida T., Horie M., Hoshino Y. y Nakazawa H. (2001). Determination of bisphenol A in canned vegetables and fruit by high performance liquid chromatography. *Food Additives & Contaminants* 18, 69-75.

- Zoeller R. T., Brown T. R., Doan L. L., Gore A. C., Skakkebaek N. E., Soto A. M., Woodruff T. J. y Vom Saal F. S. (2012). Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from The Endocrine Society. *Endocrinology* 153, 4097-4110.

Anexo

Evaluation of treatment with bone marrow derived monocytes of minipigs in muscle fibres after exposure to Bisphenol-A

Carlos Abellán^{1*}, Ana Molina^{1#}, Cristina Bellido¹, Alfonso Blanco²,
and Rosario Moyano¹

¹Departamento Farmacología, Toxicología, y Medicina Legal y Forense, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales Carretera Madrid-Cádiz s/n, Córdoba, Spain

²Departamento Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales Carretera Madrid-Cádiz s/n, Córdoba, Spain

ABELLÁN, C., A MOLINA, C. BELLIDO, A. BLANCO, R. MOYANO:
Evaluation of treatment with bone marrow derived monocytes of minipigs in muscle fibres after exposure to Bisphenol-A. Vet. arhiv 89, 379-391, 2019.

ABSTRACT

Bisphenol-A (BPA) has been described as an endocrine disruptor that impairs human and animal health. As BPA is present in food and drink, due to leaching from polycarbonate containers or aluminum cans, humans are constantly exposed to it. Due to the importance for public health of unconscious exposure to BPA, we conducted a study of its rapid action on muscle tissue and its possible treatment with bone marrow monocytes. For this purpose, 16 minipigs were randomly distributed ($n = 4$) to one of the following experimental groups: the control group treated with BPA (for 4 months), the BPA-withdrawal group (treated for 2 months with BPA and two months without), and the bone marrow monocytes (MN) group (treated for 2 months with BPA, after which it was withdrawn and MN treatment began lasting 2 months). At the end of the treatments, biopsy of the longissimus lumbaris (LL) was carried out. The samples were analysed by optical and electron microscopy. In our study, it was observed that after continuous exposure to BPA some alterations appeared both in the muscle fibres and in the collagen fibres of their sheaths. The group from which BPA was withdrawn for two months exhibited a reversible degenerative action, with a partial recovery of both the muscle and the collagen fibres. In the last study group, we evaluated the action of the bone marrow monocytes on the modified muscle tissue, and observed that they presented a notable recovery action since practically all the muscle and collagen fibre alterations which had appeared were reversed.

Key words: Bisphenol A; minipig; muscle; bone marrow monocytes

*Corresponding author:

Ana María Molina López, Departamento Farmacología, Toxicología, y Medicina Legal y Forense, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba, Campus de Rabanales Carretera Madrid-Cádiz s/n, Córdoba 14071, Spain, E-mail: f2molina@uco.es

Both authors contributed equally

ISSN 0372-5480

Printed in Croatia

Introduction

Numerous environment pollutants can act as endocrine disruptors (EDCs), modifying the equilibrium of the endocrine system, and also the muscular-skeletal system. Therefore, the number of scientific studies focusing on the investigation of the toxic action mechanisms of these compounds, and their repercussions on the environment and health has multiplied (MANDICH et al., 2007; MOLINA et al., 2013; MORTAZAVI et al., 2013; GIMÉNEZ et al., 2016; LORA et al., 2016; BARASONA et al., 2017; MOLINA et al., 2018).

The effects of most of these substances with endocrine activity are caused as a result of their action due to their structural similarity to steroid hormones. They are capable of triggering a similar response in target cells to those of endogenous hormones, or of inhibiting that response by exerting an antagonistic effect. So, the compounds most studied are those with the capacity to mimic the effects of androgens and oestrogens on the organism.

Bisphenol A (BPA) is a known EDC that is present in a great variety of consumer products, a large number of which come into direct contact with food by means of drink or food containers, in the protective inside coating of the tins of conserved foods, among others. They are also used in multiple non-alimentary products such as dental sealants, medical equipment and materials, which could result in creating a public health problem (VANDERBERG et al., 2007; MILEVA et al., 2014).

Due to the beneficial action produced, in general and in muscles in particular, in the degenerative processes of the paracrine substances in bone marrow monocytes, these compounds are being employed in the treatment of muscle pathologies. Monocytes are applied at high doses via the bloodstream or in direct treatment of the area that is the focus of study, and both treatments are also recommended simultaneously. The effects of BPA on muscle fibres may be reversible, so that the use of treatments with monocytes for the recovery of fibres could be applicable (CARMONA et al., 2017).

The current research consists of two different phases. First, with a daily dose of BPA, we studied the possible alterations caused by EDCs in muscle fibres, and, in parallel, we analysed the modifications occurring in fibrocytes and collagen fibres. Second, once the BPA action had been verified, we evaluated whether the paracrine treatment factors, which act directly on muscle and connective fibres, could provoke a recovery of the latter.

Materials and methods

Animals. Sixteen two-month-old "minipigs" were used, from the breeding colony of the Experimental Animal Service at the University of Córdoba, where they were stabled during the whole experiment, following the conditions specified in the guidelines relative to the housing and care of animals (ANONYM., 2013). All the experiment protocols were

approved by the Córdoba University Committee of Bioethics. The animals were fed once a day during the study (Nantaunic, Nantaporc PI[®]) and distributed randomly to one of the four experiment groups: Control Group (GC), (n = 4); the group treated with BPA (n = 4) orally 1 mg/kg bw/day (Sigma Aldrich[®], St. Luis, EE.UU) for four months; the third group - BPA-withdrawal (n = 4) which, after two months of treatment, was taken off BPA for two more months up until their biopsy; and a fourth group, treated with monocytes (MNCs) (n = 4). The animals of this group were treated with BPA for 2 months, then it was withdrawn and they began treatment with MNCs for 2 months. In all the treated groups, BPA was administered orally by a syringe. At the end of the different periods of exposure, treatment and/or withdrawal, depending on the study group, samples were collected by means of a biopsy of the longissimus lumbaris (LL) muscle, for subsequent study.

Isolation of mononucleate cells (MNC) derived from the bone marrow (BM). The MNCs were extracted from the BM proceeding from the femur and tibia of the minipigs. The medullary cavity of both bones was repeatedly washed with 10mL of saline solution. The suspension obtained was collected in sterile tubes, filtered and subsequently centrifuged at 4 °C for 5 minutes. The remaining supernatant was discarded, and the pellet with the cell concentrate of the BM from both bones was re-suspended in 1 mL saline.

The erythrocytic fraction and the granulocytes were eliminated from the medullary cell for enrichment of the MNC fraction by density gradient centrifugation for 20 minutes at 1500 g and 20 °C, using Lymphoprep[™] (Oslo, Norway). After centrifugation, the MNC concentrate was collected. This MNC suspension was washed adding 5mL of PBS, phosphate-buffer saline, to completely eliminate the Ficoll (branched hydrophilic polysaccharides) remains. The resulting pellet was resuspended in a protein medium (FBS, foetal bovine serum) at a concentration of 5×10^6 MNCs/mL. Cell viability was determined by the Trypan blue exclusion method (Lonza, Verviers, Belgium) and the cells were counted in a Neubauer camera. This cell suspension was employed as treatment in the *in vivo* study.

Histological study. Light microscopy: For structural evaluation, the samples were routinely processed for paraffin sections by fixing in 10% formaldehyde, dehydrating in graded series of ethanol, immersing in xylol and embedding in paraffin wax. Every tenth section (4 µm thick) of each block was stained with haematoxylin and eosin, and used for the morphological study. Additionally, muscle sections were subjected to Masson's trichrome stain, which stains collagen blue, providing an excellent colour contrast differentiating it from other structures.

Electron microscopy. For the ultrastructural study, small randomly selected samples were primarily fixed in a 2% glutaraldehyde solution in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) overnight at 4 °C, and then refixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M phosphate buffer (pH 7.4) for 30 min. After dehydration in graded ethanol series and embedding in Araldite,

semi-thin and ultra-thin sections were cut on an LKB ultramicrotome. Semi-thin sections were stained with toluidine blue, whereas ultra-thin sections were double-stained with uranyl acetate and lead citrate. Ultra-thin sections were viewed and photographed under a JEM 1400 transmission electron microscope (TEM; JEOL, Ltd.).

In order to avoid individual variations, structural and ultra-structural evaluations were carried out by the same pathologist.

Results

In the control group, a close relationship was evidenced under the light microscope between the muscle fibres and the endomysium, perimysium and epimysium, all of these sheaths being relatively thin. The muscle fibre is a multinucleate cell with its nucleus arranged in a peripheric position, and its contractile material is spread longitudinally over so-called myofibrils, with highly evident transversal striae, especially the A and I bands. The relationship of the muscle fibres with the collagen fibre of the endomysium was detected using the trichrome technique. However, certain muscle areas were observed in which that activity appeared to be accentuated or diminished (Figs 1A, B, D).

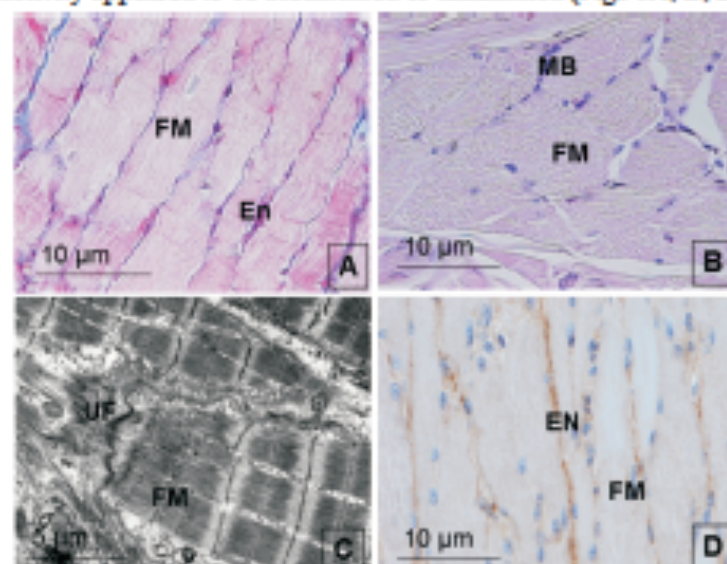


Fig. 1. Histopathological changes in muscle. Control Group. A. Image of the muscle fibre section under light microscope. Masson's trichrome technique. Muscle fibres (MF) surrounded by a thin endomysium (En). B. Image under light microscope. Apparently normal muscle fibres (MF), and area of myoblast association (MB). C. Ultrastructural image. Apparently normal muscle fibres (MF), with area of fibrous unions between them (FU). D: Image of the muscle fibre section under light microscope. Immunocytochemical technique, anti-collagen serum 1. The muscle fibres can be seen (MF), surrounded by a thin endomysium (En), giving a positive reaction to staining.

The ultrastructure they presented was classical; the nuclei were arranged next to the plasma membrane, which, in turn, was related to a highly dense microenvironment, alongside the existence of invaginations configured by the "T" tubules (Fig. 1C).

In the group treated with BPA we observed, first, very marked fibrillar pleomorphism, with a prominent diminution in fatty tissue and endomysial connective tissue. Inside the marked pleomorphism there was clear fibrillar hypertrophy, and also some fibres of a smaller size. The fibrillar hypertrophy was accompanied by modifications in its components. There were alterations in the nucleus. Although the muscle fibres were multinucleate and arranged peripherally, a large amount of their components being "centralized", *i.e.* they had lost their localization and became arranged towards the centre of the sarcoplasm. The principal alteration produced by BPA in muscle fibres was undoubtedly cell hypertrophy which, both in the transversal and longitudinal sections, displayed a notable increase in sarcoplasm and myofibrils (Fig. 2).

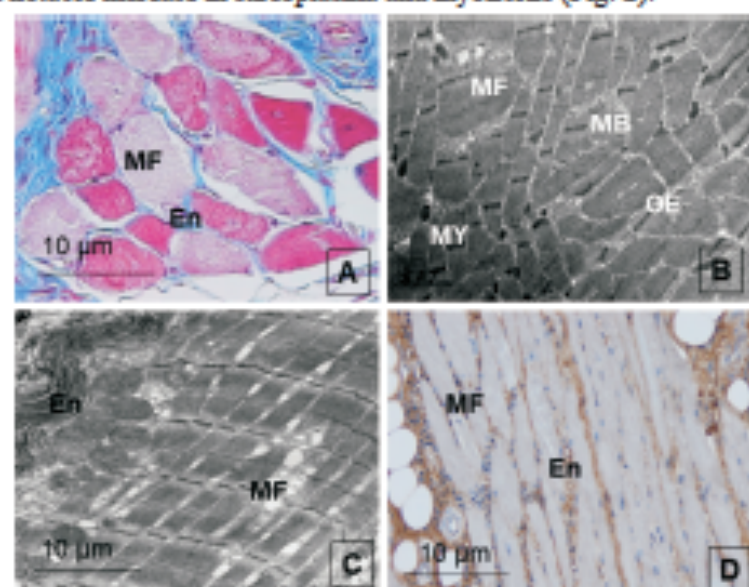


Fig. 2. Histopathological changes in muscle. Group treated with BPA. A. Image of the muscle fibre section, under the light microscope Masson trichrome technique. Detail of muscle fibres, degenerated and hypertrophic (MF), surrounded by a thick endomysium (En). B. Ultrastructural image. Detail of muscle fibres (MF), arranged irregularly on the myofibrils (MY). Detail of muscle fibre (MF), in relation to degenerated myoblasts (MB), surrounded by an endomysium with oedema (OE). D. Ultrastructural image. Vacuolized muscle fibres (MF), surrounded by a fibrous band of endomysium (En). E: Image under the light microscope of the muscle fibre section. Immunocytochemical technique, anticollagen serum 1. The muscle fibres (MF) were noted surrounded by thick bands of endomysium (En) giving a positive reaction to staining.

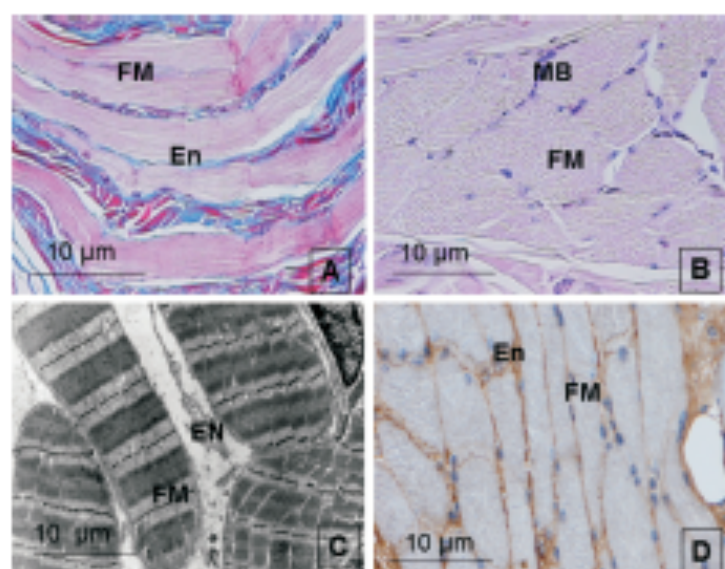


Fig. 3. Histopathological changes in muscle. Group with BPA withdrawal. A. Image under the light microscope of the muscle fibre section. Masson trichrome technique. Hypertrophic muscle fibres (MF) surrounded by a thick endomysium (En). B. Image under the light microscope. Hypertrophied muscle fibres stood out (MF) associated with myoblasts (MB). C. Ultrastructural image. Detail of muscle fibres showing apparently normal striae (MF) surrounded by thick fibrous endomysium and with oedema (OE). D. Image under light microscope of the muscle fibre section. Immunohistochemical technique. Anti-collagen serum 1. The muscle fibres are seen (MF) surrounded by thick bands of endomysium (En) with a positive reaction to staining.

With regard to the group exposed to BPA for two months, and the two groups in which it was withdrawn, under the light microscope the fibres showed prominent pleomorphism, visible hypertrophy, with images of nuclei centralization, loss of striae and homogenization, and, above all, "fingerprint" degenerations and canalizations in the sarcoplasm. What undoubtedly and specifically stood out in this experimentation group was the presence of generalized oedema or anasarca; this oedema was manifested by separation between fibres and the interstitial tissue of the endomysium, leading to the loss of its normal texture and it appeared clear and homogenized (Fig. 3A, B, D).

In the electron microscope studies, the muscle fibres showed modifications were fundamentally characterized by an increase and centralization in the nuclei, and especially a disproportionate increase in myofibrils, which resulted in the internal disorganization of the myofilaments studied in the group treated with BPA. To be specific, a generalized oedema was detected, and, inside the fibres, dilatations in the "T" tubules and in the

endoplasmic reticulum were noted. In the connective interstitium, wide, very clear areas were evidenced, with the loss of the structure of its connective components (Fig. 3C).

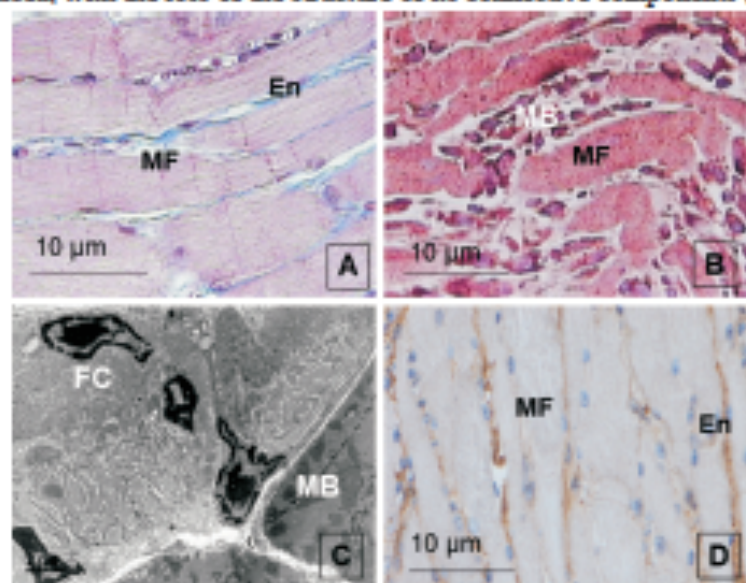


Fig. 4. Histopathological changes in muscle. Group treated with monocytes. A. Image of the muscle fibre section under the light microscope - Masson trichrome technique. Muscle fibres (MF) surrounded by a thin endomysium (En). B. Image under the light microscope. Mature muscle fibres (MF) and presence of myoblast accumulation (MB). C. Ultrastructural image. Presence of myoblasts noted (MB) and fibrocytes (FC). D. Image of the muscle fibre section under the light microscope. Immunocytochemical technique, anti-collagen serum I. There were muscle fibres (MF) surrounded by a thin endomysium (En) that had a positive reaction to staining.

In the group treated with monocytes, the muscle displayed a normal proportion between its tissue and the connective tissue. The muscle fibre was seen to be multinucleate, with peripheric nuclei, and its fibrils organized themselves with normal striae. With the trichrome technique it was possible to confirm an obvious relationship between all their components (Fig. 4D).

The ultrastructure presented by the fibres was a relatively classic one. The nuclei were arranged close to the plasma membrane, which, in turn, was related to a highly dense microenvironment, with the existence of invaginations configuring the "T" tubules. The most important elements were the myofibrils. The first thing to note is that these contractile fibrils were arranged parallel to each other and spread longitudinally over the whole cell volume, and at no time did they change direction (Fig. 4C).

In the group treated with monocytes, under the light microscope groups of small nucleate cells stood out, that were identified with satellite cells or myoblasts. There were some cells with irregular edges in their ultrastructure, and it was even difficult to identify those edges. What was notable was the presence of numerous nuclei and, more important still, contractile material of myosin and actin, forming myofibrils (Fig. 4 A, B).

Discussion

The low-dose effects of endocrine-disrupting chemicals such as BPA are mediated by endocrine-signalling pathways that have evolved to act as powerful amplifiers, with the result that important changes in cell function can occur in response to extremely low concentrations (WELSHONS et al., 2003). In June 2017, the European Chemical Agency (ECHA) classified BPA as a "substance of very high concern" because of its endocrine-disrupting properties, which have serious effects on human health.

The action of BPA as a neuroendocrine disruptor has been widely studied (MOLINA et al., 2013; VANDERBERG et al., 2013; JEDEON et al., 2016; LORA et al., 2016; BARASONA et al., 2017). However, its effect as an xenoestrogen on muscle tissue has not been evaluated in the same way (INDUMATHI et al., 2013; MORTAZAVI et al., 2013; WANG et al., 2013; GIMENEZ et al., 2016). Due to its importance as an environmental pollutant and the possible exposure to it through diet, the objective of this study was to establish an evaluation of the possible effects of continuous exposure to BPA on muscle tissue, as well as the latter's capacity to recover after withdrawing the treatment. We also studied whether a treatment with monocytes, applied in muscle pathologies of other aetiologies, could be effective for lesions caused by EDCs.

Very many studies have evaluated the toxicity of BPA, using rodents or fish as biomodels (HATEF et al., 2012; LOPEZ-CASAS et al., 2012; WANG et al., 2013), and there are a few references to work employing other experimentation animal species (CHOI and JEUNG, 2003; GAO et al., 2010; INDUMATHI et al., 2013). In our study it was observed that the hypertrophy of muscle fibres resulting from BPA action was mainly due to an increase in contractile material. This phenomenon was detected even under a light microscope, due to the increase in the size of the fibres, but, without any doubt, it was observed best under an electron microscope. The myofibrils presented in a larger number and showed serious alterations. For that reason, under both the light and electron microscopes, images in which the myofibrils were arranged in arcades were detected, with fingerprint degenerations being formed. These modifications could even show canalizations in the cytoplasm, and this type of lesion was previously described by GIMENEZ et al. (2016) using the same biomodel, BPA dose and exposure time, as well as the action of other substances, that could act as xenoestrogens (PELLEGRINO et al., 2004; DOUILLARD et al., 2011).

On withdrawing the BPA, some degeneration images were detected under both the light and electron microscopes, although they were less marked than those in the group treated continuously with BPA, which would demonstrate a certain level of recovery and the reversibility of the muscle lesions.

In the group treated with monocytes, the myoblasts acted following two patterns. First, together with the increase in the number of nuclei, the organoids participating in the synthesis of contractile proteins became more evident, with extensive development of the transfer vesicle. This increase in activity led, in this first phase, to myosin and actin filaments beginning to be produced indiscriminately. Then, subsequently, the new filaments, in the second phase, organized themselves, forming the sarcomeres of the myofibrils. As observed in the group treated with paracrine substances, the satellite cells that were in the activation phase were maintained within the basement membrane of the muscle fibre, associating themselves with capillaries. On one hand, these satellite cells increased their metabolism, and then they subsequently re-organized themselves in parallel to the fibres, even forming new multinucleate and contractile ones. These signs of recovery were similar to data observed by GIMÉNEZ et al. (2016), who treated muscle lesions caused by BPA exposure with platelet-derived growth factors. At present, there are no references related to paracrine treatment after exposure to BPA, so what was observed in our study is highly novel and leads us to believe that this type of treatment could be used in cases of chronic exposure to oestrogenizing substances with severe effects, such as those being used in other pathologies.

One of the most important processes in the recovery of the muscle fibres was the state in which the endomysium was left. From that point on, some important differences were found between the recovery group with no treatment, the group with only the withdrawal of BPA, and the group with subsequent paracrine treatment after BPA withdrawal. In the withdrawal group, the muscle fibres acquired an acceptable degree of recovery of the myofibrils, as described when studying the sarcomeres. The same happened in the fibres treated with paracrine factors, so that in both cases it could be considered that the fibres had recovered their vitality and function. It was observed that in the endomysium of the fibres with no paracrine treatment, heavy condensation of collagen fibre was produced. However, in those treated with monocytes, the collagen was practically non-existent and only its capillaries persisted, coinciding with what was reported by GIMÉNEZ et al. (2016) in mini-pigs treated with platelet-rich plasma. This phenomenon indicated that recovery in the cases of monocyte treatment was good both in the fibre and in the endomysium, whereas, in the withdrawal group, the fibre recovered its functionality, but at an endomysium level the massive appearance of the collagen fibres would trigger fibrosis processes, which would make these muscles susceptible to subsequent tears.

In conclusion, we established a model for necrosis and degeneration of muscle fibres by exposure to BPA, that served as a starting-point of treatments for their recovery from the activation of their myoblasts and of the muscle fibres themselves. It was seen how, after BPA withdrawal, there was a partial recovery of the histological modifications appearing in the muscle. Also, the treatment with monocytes showed the potential regenerating capacity of these compounds in a damaged muscle after exposure to an xenoestrogen.

Acknowledgements

The authors wish to thank the Spanish Junta de Andalucía (P09-AGR-514) for their financial support for this study.

The authors wish to thank the Institut für Pathologie Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (Germany), especially Dr Wolfgang Baumgärtner and the electron microscopy technician for their encouragement during the ultrastructural image evaluation.

References

- ANONYMOUS (2013): Royal Decree 53/2013, of 1 February, by which basic principles are established for the protection of animals used in experimentation and other scientific purposes, including teaching (in Spanish).
- BARASONA, M., A. MOLINA, A. BLANCO, N. AYALA, R. MOYANO (2017): Assessment of the effects of bisphenol-A as a disruptor on ionic regulation in zebrafish through a study of their chloride and prolactin cells. *Acta Adriat.* 58, 105-116.
DOI: 10.32582/aa.58.1.8
- CARMONA, M. D., S. CAÑADILLAS, M. ROMERO, A. BLANCO, S. NOGUERAS, C. HERRERA (2017): Intramyocardial bone marrow mononuclear cells versus bone marrow-derived and adipose mesenchymal cells in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Cytotherapy* 19, 947-961.
DOI: 10.1016/j.jcyt.2017.05.006
- CHOI, K., E. JEUNG (2003): The biomarker and endocrine disruptors in mammals. *J. Reprod. Develop.* 49, 337-345.
DOI: 10.1262/jrd.49.337
- DOUILLARD, A., O. GALBES, B. ROSSANO, B. VERMUS, A. BONNIEU, R. CANDAU (2011): Time course in calpain activity and autolysis in slow and fast skeletal muscle during clenbuterol treatment. *Can. J. Physiol. Pharm.* 89, 117-25.
DOI: 10.1139/y10-114
- GAO, X., L. YU, L. CASTRO, A. MOORE, T. HERMON, C. BORTNER, M. SIFRE, D. DIXON (2010): An endocrine-disrupting chemical, fenvalerate, induces cell cycle progression and collagen type I expression in human uterine leiomyoma and myometrial cells. *Toxicol. Lett.* 196, 133-141.
DOI: 10.1016/j.toxlet.2010.03.004

- GIMÉNEZ, M., A. MOLINA, A. BLANCO, M. AYALA, R. MOYANO (2016): Structural and ultrastructural evaluation of fibre muscles after exposure to Bisphenol-A, and a study of their possible recovery after treatment with platelet-rich plasma. *Vet. arhiv* 86, 49-64.
- HATEF, A., S. M. HADI ALAVI, A. ABDOLFATAH, P. FONTAINE, M. RODINA, O. LINHERT (2012): Adverse effects of bisphenol A on reproductive physiology in male goldfish at environmentally relevant concentrations. *Ecotox. Environ. Safe.* 76, 56-62.
DOI: 10.1016/j.ecoenv.2011.09.021
- INDUMATHI, D., S. JAYASHREE, J. SELVARAJ, C. MAVILVANAN, N. AKILAVALLI, K. BALASUBRAMANIAN (2013): Effect of bisphenol A on insulin signal transduction and glucose oxidation in skeletal muscle of adult male albino rat. *Hum. Exp. Toxicol.* 32, 960-71.
DOI: 10.1177/0960327112470273
- JEDON, K., S. LOIODICE, K. SALHI, M. LE NORMAND, S. HOUARI, J. CHALOYARD, A. BERDAL, S. BABAJKO (2016): Androgen receptor involvement in rat amelogenesis: an additional way for endocrine-disrupting chemicals to affect enamel synthesis. *Endocrinology* 157, 4287-4296.
DOI: 10.1210/en.2016-1342
- LÓPEZ-CASAS, P., S. C. MIZRAK, L. A. LÓPEZ-FERNÁNDEZ, M. PAZ, D. G. DE ROOIJ, J. DEL MAZO (2012): The effects of different endocrine disruptors defining compound-specific alterations of gene expression profiles in the developing testis. *Reprod. Toxicol.* 33, 106-115.
DOI: 10.1016/j.reprotox.2011.12.012
- LORA, A., A. MOLINA, C. BELLIDO, A. BLANCO, J.G. MONTERDE, R. MOYANO (2016): Effects of bisphenol-a on the testicular parenchyma of zebrafish using histomorphologic methods. *Vet. Med-Czech.* 61, 577-589.
DOI: 10.17221/212/2015-vetmed
- MANDICH, A., S. BOTTERO, E. BENFENATI, A. CEVASCO, C. ERRATICO, S. MAGGIONI, A. MASSARI, F. PEDEMONTE, L. VIGANO (2007): *In vivo* exposure of carps to graded concentrations of bisphenol A. *Gen. Comp. Endocr.* 153, 15-24.
DOI: 10.1016/j.ygcen.2007.01.004
- MILEVA, G., S. L. BAKER, A. KONKLE, C. BIELAJEW (2014): Bisphenol-A: epigenetic reprogramming and effects on reproduction and behavior. *Int. J. Environ. Res. Pu.* 11, 7537-7561.
DOI: 10.3390/ijerph110707537
- MOLINA, A., A. LORA, A. BLANCO, J. MONTERDE, N. AYALA, R. MOYANO (2013): Endocrine-active compound evaluation: qualitative and quantitative histomorphological assessment of zebrafish gonads after bisphenol-A exposure. *Ecotox. Environ. Safe.* 88, 155-162.
DOI: 10.1016/j.ecoenv.2012.11.010

- MOLINA, A., N. ABRIL, N. MORALES-PIETO, J. MONTERDE, A. LORA, N. AYALA, R. MOYANO (2018): Evaluation of toxicological endpoints in zebrafish after bisphenol A exposure. *Food Chem. Toxicol.* 112, 19-25.
DOI: 10.1016/j.fct.2017.12.026
- MORTAZAVI, S., A. BAKHTIARI, A. SARI, N. BAHRAMIFAR, F. RAHBARIZADEH (2013): Occurrence of endocrine disruption chemicals (Bisphenol A, 4-nonylphenol, and Octylphenol) in muscle and liver of, *Cyprinus Carpio Common*, from Anzali wetland, Iran. *B. Environ. Contam. Tox.* 90, 578-84.
DOI: 10.1007/s00128-013-0964-0
- PELLEGRINO, M. A., G. D'ANTONA, S. BORTOLOTTI, F. BOSCHI, O. PASTORIS, R. BOTINELLI, B. POLLA, C. REGGIANI (2004): Clenbuterol antagonizes glucocorticoid-induced atrophy and fibre type transformation in mice. *Exp. Physiol.* 89, 89-100.
DOI: 10.1113/expphysiol.2003.002609
- VANDERBERG, L. N., R. HAUSER, M. MARCUS, N. OLEA, W. V. WELSHONS (2007): Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reprod. Toxicol.* 24, 139-177.
DOI: 10.1016/j.reprotox.2007.07.010
- VANDERBERG, L. N., S. EHRLICH, S. M. BELCHER, N. BEN-JONATHAN, D. C. DOLINOY, E. R. HUGO, P. A. HUNT, R. R. NEWBOLD, B. S. RUBIN, K. S. SAILI, A. M. SOTO, H. S. WANG, F. VOM SAAL (2013): Low dose effects of bisphenol A. An integrated review of *in vitro*, laboratory animal, and epidemiology studies. *Endocrine Disruptors* 1:1, e25078, 1-20.
DOI: 10.4161/endo.26490
- WANG, X., Q. DONG, Y. CHEN, H. JIANG, Q. XIAO, Y. WANG, W. LI, C. BAI, C. HUANG, D. YANG (2013): Bisphenol A affects axonal growth, musculature and motor behaviour in developing zebrafish. *Aquat. Toxicol.* 142, 104-113.
DOI: 10.1016/j.aquatox.2013.07.011
- WELSHONS, W. V., K. A. THAYER, B. M. JUDY, J. A. TAYLOR, E. M. CURRAN, F. S. VOM SAAL (2003): Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ. Health Persp.* 111, 994-1006.
DOI: 10.1289/ehp.5494

Received: 17 February 2018

Accepted: 18 March 2019

ABELLÁN, C., A. MOLINA, C. BELLIDO, A. BLANCO, R. MOYANO: Učinkovitost liječenja mišićnih vlakana minisvinja monocitima iz koštane srži nakon izloženosti bisfenolu A. *Vet. arhiv* 89, 379-391, 2019.

SAŽETAK

Bisfenol A (BPA) uzrokuje endokrine poremećaje koji narušavaju zdravlje ljudi i životinja. Kako se BPA, uz svoju prisutnost u polikarbonatnim posudama i aluminijskim limenkama, nalazi i u hrani i piću, ljudi su mu stalno izloženi. Zbog važnosti u javnom zdravstvu i nepostojanja svijesti o izloženosti BPA-u, istražili

smo njegovo brzo djelovanje na mišićna tkiva i mogućnosti liječenja monocitima iz koštane srži. U tu je svrhu 16 minisvinja nasumično raspoređeno u četiri skupine ($n = 4$): 1. kontrolnu skupinu, 2. skupinu koja je bila izložena BPA-u četiri mjeseca, 3. skupinu koja je dva mjeseca bila izložena BPA-u, a zatim joj je uskraćen, 4. skupinu koja je dva mjeseca bila izložena BPA-u, a zatim je dva mjeseca liječena monocitima iz koštane srži. Na kraju liječenja učinjena je biopsija longissimus lumborum (LL). Uzorci su analizirani optičkom i elektronskom mikroskopijom. Istraživanje je pokazalo da nakon kontinuirane izloženosti BPA-u postoje promjene i u mišićnim i u kolagenskim vlaknima. Skupina kojoj je BPA uskraćen nakon dva mjeseca pokazala je reverzibilni degenerativni učinak, s djelomičnim oporavkom i mišićnih i kolagenskih vlakana. U posljednjoj ispitivanoj skupini procijenili smo učinak monocita iz koštane srži na promijenjena mišićna tkiva i promatrali ima li znatnijeg oporavka s obzirom na to da su se gotovo sva promijenjena mišićna i kolagenska vlakna regenerirala.

Ključne riječi: bisfenol A; minisvinja; monociti iz koštane srži
